

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIOS DE INMUNIDAD Y EFICACIA DE LA VACUNACIÓN  
EXPERIMENTAL CON ADN Y MVA RECOMBINANTES QUE EXPRESAN  
ANTÍGENOS DEL VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA**

**PRESENTADA POR**

**María Elena López Gil**

**Directores**

Alejandro Brun Torres  
Gema Lorenzo Alguacil

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Sanidad Animal**



**ESTUDIOS DE INMUNIDAD Y EFICACIA DE LA  
VACUNACIÓN EXPERIMENTAL CON ADN Y MVA  
RECOMBINANTES QUE EXPRESAN ANTÍGENOS DEL  
VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT**



Memoria para optar a grado de Doctor presentada por

**M<sup>a</sup> Elena López Gil**

Madrid, 2014



El Dr. Alejandro Brun Torres y la Dra. Gema Lorenzo Alguacil,

Informan:

Que la memoria titulada, **“Estudios de inmunidad y eficacia de la vacunación experimental con ADN y MVA recombinantes que expresan antígenos del virus de la fiebre del Valle del Rift”**, presentada por M<sup>a</sup> Elena López Gil para la obtención del grado de Doctor, se ha realizado bajo nuestra supervisión y autorizamos su presentación para ser juzgada por la comisión correspondiente.

Y, para que conste a los efectos oportunos, firman la presente en Madrid, a 12 de Septiembre de 2014.



Dr. Alejandro Brun Torres



Dra. Gema Lorenzo Alguacil



## ***Agradecimientos***

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Alejandro y Gema, la oportunidad ofrecida para ser formada en la investigación durante estos casi cinco años. Sin duda, este trabajo no habría sido posible sin vuestra ayuda, orientación y comprensión ofrecidas. Gracias por todo el tiempo dedicado, y a todas las enseñanzas aprendidas.

También quiero dar las gracias a mis compañeros del laboratorio L-2 por todos los momentos compartidos. A Raquel y Esther por su apoyo ofrecido durante mis inicios en el labo, y a Hani por su ayuda con las diferentes técnicas. A Belén, por tus consejos en esta tesis, y a Paco del L-12, gracias por todo tu trabajo en animalario. ¡Como voy a olvidarme de los compañeros del L-18! Eva y Paco, gracias por vuestro apoyo científico y moral en esta tesis. A Javier, siempre charlando en el labo. A las becarias del CISA, casi todas ya doctoras; Cristina, Jana, Susana, Teresa, Nina y Patricia. A Lucía, por tu cariño en los pasillos. Al servicio de animalario, en especial a Pilar Pallarés, gracias por vuestro trabajo. Y como no quiero olvidarme de nadie, gracias a todos mis compañeros del CISA.

A Nuria, Fernando, Raquel, Mariano y demás compañeros del CReSa (Barcelona), gracias por vuestro esfuerzo durante el experimento de ovejas.

*To George Warimwe, Matt Cottingham, Naif Alharbi and Sarah Gilbert, for your help and training during my stay at Jenner Institute, University of Oxford(UK).*

A mi familia, por todo el cariño recibido. A mi madre, allá donde estés. A mi hermano Alberto, por cuidarme y por aguantarme durante todos estos años, gracias por todo. A mi tío, por no dudar que terminaría este trabajo, y a mi abuela, por todo su amor recibido. Como no a mis amigas Yosune y Leti, por sus ánimos para terminar esta tesis, ¡lo conseguimos! Por último, gracias David por toda tu alegría, risas, cariño y apoyo que han hecho más llevadero este camino. Gracias a todos.



*A mi familia y a David*





## Abreviaturas

• Ac	Anticuerpo(s)
• AcMo	Anticuerpo monoclonal
• ADN	Ácido desoxirribonucleico
• APC	Célula presentadora de antígeno
• ARN	Ácido ribonucleico
• ARNm	ARN mensajero
• CCHFV	Virus de la fiebre hemorrágica Crimea-Congo
• Ct	Ciclo umbral
• CTL	Linfocito T CD8 <sup>+</sup> citotóxico
• DO	Densidad óptica
• dpi	Día post-infección
• DS	Desviación standard
• ECP	Efecto citopático
• ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
• ELISPOT	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent SPOT</i>
• GFP	Proteína verde fluorescente
• HRPO	<i>Horseradish peroxidase</i>
• ICCS	Marcaje intracelular de citoquinas
• IFI	Inmunofluorescencia indirecta
• IFN	Interferón
• Ig	Inmunoglobulina
• IL	Interleucina
• IM	Intramuscular
• IP	Intraperitoneal
• kb	Kilobase
• MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
• moi	Multiplicidad de infección
• MVA	Virus Vaccinia modificado de la cepa Ankara
• MVA-GnGc	MVA codificando las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV

• MVA-N	MVA codificando la nucleoproteína N de RVFV
• MVAr	MVA recombinante
• NK	<i>Natural killer</i>
• nt	Nucleótido
• ORF	Fase de lectura abierta
• p/v	Peso/volumen
• PBS	Tampón fosfato salino
• pCMV	Plásmido con promotor del citomegalovirus humano
• pCMV-GFP	pCMV codificando GFP
• pCMV-M4	pCMV codificando las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV
• pCMV-N	pCMV codificando la nucleoproteína N de RVFV
• PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
• pfu	Unidad formadora de placa
• PHA	Fitohemaglutinina
• pp	Pellet
• RT	Temperatura ambiente
• RVF	Fiebre del Valle del Rift
• RVFV	Virus de la fiebre del Valle del Rift
• SC	Subcutánea
• SFBi	Suero fetal bovino inactivado
• SFC	Células formadoras de spots
• ss	Sobrenadante
• TCID <sub>50</sub>	Dosis infectiva 50 en cultivo celular
• TK	Timidina kinasa
• UTRs	Regiones no codificantes
• v/v	Volumen/volumen
• VLPs	Partículas similares a virus
• VNT	Ensayo de neutralización viral
• VV	Virus Vaccinia
• WB	Western blot
• wt	Tipo parental

## ÍNDICE



**ÍNDICE**

<b>I</b>	<b>RESUMEN</b>	1
<b>II</b>	<b>SUMMARY</b>	9
<b>III</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	15
1	EL VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT (RVFV) Y LA ENFERMEDAD	17
1.1	Historia y distribución geográfica	17
1.2	Transmisión de la enfermedad	20
1.3	Clasificación taxonómica del RVFV	23
1.4	Morfología, estructura y genoma del RVFV	24
1.5	Ciclo de infección viral	29
1.6	Respuesta inmunológica del hospedador frente a la infección	31
1.7	Patogénesis y signos clínicos	33
1.8	Diagnóstico y prevención de la enfermedad	36
2	Modelos animales de la infección	38
3	Vacunas frente a la RVF	42
3.1	Vacunas inactivadas y atenuadas	43
3.2	Vacunas de nueva generación	45
4	Vacunas ADN	50
5	Vacunas MVA	53
<b>IV</b>	<b>OBJETIVOS</b>	57
<b>V</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	61
1	CULTIVOS CELULARES	63
1.1	Líneas celulares eucariotas	63
1.2	Cepa de <i>Escherichia coli</i> (E. coli)	63
2	VIRUS	63
2.1	Cepa MP12 RVFV	63
2.2	Aislados virulentos de RVFV	64
3	GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES ADN	65
3.1	Generación de pCMV-M4 y pCMV-N	66
3.2	Ensayos de expresión <i>in vitro</i>	66
4	GENERACIÓN DE MVA RECOMBINANTES (MVA <sub>r</sub> )	66
4.1	Clonaje, amplificación y purificación de virus MVA <sub>r</sub>	66
4.2	Ensayos de expresión en células infectadas	70
5	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	70
5.1	Ratones	70

5.2	Ovejas. ....	71
6	ENSAYOS DE ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA:....	72
6.1	Ensayos de respuesta inmunológica humoral: .....	72
6.2	Ensayos de respuesta inmunológica celular.....	74
6.3	Ensayos de detección de interleucinas (IL). ....	77
6.4	Ensayos de detección de IFN- $\alpha/\beta$ . ....	78
7	DETECCIÓN VIRAL. ....	79
7.1	Ensayo de aislamiento viral. ....	79
7.2	Detección de ARN viral.....	79
8	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	80
<b>VI</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>81</b>
1	OBTENCIÓN DE VACUNAS ADN/MVA Y CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA.....	83
1.1	Obtención y expresión antigénica de las vacunas ADN. ....	83
1.2	Obtención y expresión antigénica de las vacunas MVA.....	85
2	CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DE DOS AISLADOS VIRULENTOS DE RVFV Y DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL EN RATONES. ....	90
3	ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE Y DE LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR VACUNAS ADN/MVA FRENTE A RVFV EN RATONES.94	
3.1	Análisis de la respuesta inmune y de la protección inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c.....	94
3.1.1	Diseño experimental. ....	94
3.1.2	Estudio de la protección frente a RVFV en ratones BALB/c mediante vacunas ADN/MVA. ....	96
3.1.3	Detección de virus en sangre tras el desafío viral con RVFV en ratones BALB/c inmunizados. ....	98
3.1.4	Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c. ....	101
3.1.5	Estudio de la respuesta inmune celular inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c. ....	107
3.2	Estudio comparativo de la inmunidad y protección inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR <sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev <i>wild type</i> . ....	113
3.2.1	Estudio de la protección inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR <sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt. ....	113
3.2.2	Estudio de la respuesta inmune inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR <sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt. ....	116
3.2.3	Análisis de la respuesta inmune innata mediada por IFN de tipo I en ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc. ....	117
3.3	Estudio de la inmunidad y protección frente a RVFV inducida por MVAGn, MVAGc y MVAGnGc en ratones. ....	118
3.3.1	Diseño experimental. ....	118

3.3.2 Estudio de la protección frente a RVFV inducida por las vacunas MVAGn, MVAGc y MVAGnGc en ratones. ....	118
3.3.3 Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas MVA codificando las glicoproteínas de RVFV en ratones. ....	120
3.3.4 Estudio de la respuesta inmune celular inducida por vacunas MVA codificando las glicoproteínas de RVFV en ratones BALB/c.....	121
4 ESTUDIO DE LA INMUNIDAD Y PROTECCIÓN FRENTE A RVFV INDUCIDA POR MVA-GnGc EN OVEJAS.....	126
4.1 Diseño experimental de la vacunación con MVA-GnGc en ovejas. .	126
4.2 Estudio de la protección en ovejas frente al desafío con RVFV. ....	127
4.3 Detección de virus por qRT-PCR y aislamiento viral tras el desafío con RVFV en ovejas. ....	132
4.4 Análisis de la respuesta inmune humoral en ovejas inmunizadas con MVA-GnGc.....	135
<b>VII DISCUSIÓN.....</b>	<b>139</b>
1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VACUNAS MVA RECOMBINANTES FRENTE A RVFV.....	142
2 ESTUDIO DE LAS VACUNAS ADN Y/O MVA FRENTE A RVFV EN EL MODELO MURINO BALB/C.....	143
3 ESTUDIOS EN EL MODELO MURINO 129SV/EV IFNAR <sup>-/-</sup> . ....	149
4 ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD Y DE LA PROTECCIÓN DE MVA-Gn Y MVA-Gc EN EL MODELO MURINO. ....	151
5 ESTUDIO DE LAS VACUNAS MVA FRENTE A RVFV EN OVEJAS.....	153
<b>VIII CONCLUSIONES .....</b>	<b>157</b>
<b>IX BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>161</b>
<b>X ANEXO.....</b>	<b>179</b>





# **I RESUMEN**



El virus de la fiebre del Valle del Rift (RVFV) es un patógeno zoonótico que afecta a diversas especies de rumiantes y al hombre. Se trata de un arbovirus clasificado dentro de la familia *Bunyaviridae* y el género *Phlebovirus* que puede transmitirse principalmente mediante la picadura de mosquitos infectados, además de por el contacto directo con fluidos corporales procedentes de animales virémicos y la inhalación de aerosoles.

La enfermedad causada por este patógeno, la fiebre del Valle del Rift (RVF), es endémica en el África sub-sahariana, Egipto y Arabia Saudí. En el África subecuatorial los brotes son cíclicos y están ligados a la presencia de fuertes lluvias que permiten el establecimiento de zonas de cría de mosquitos. A su vez, el riesgo de introducción del virus en zonas libres de esta enfermedad como Europa o América podría incrementarse por fenómenos asociados al cambio climático así como por el auge en el comercio internacional de animales. Estos hechos junto al amplio rango de hospedadores del virus y la alta competencia vectorial que presentan numerosas especies de mosquitos, podrían facilitar la aparición de brotes de la enfermedad con consecuencias impredecibles para la salud pública y animal.

La vacunación es la única estrategia efectiva para el control y la prevención de esta enfermedad. Sin embargo, las vacunas disponibles en la actualidad están basadas en virus atenuados y/o inactivados, y presentan diversos efectos adversos como teratogénesis, abortos o baja inmunogenicidad respectivamente, por lo que ninguna de ellas se ha aprobado para su uso en el hombre o en el ganado en países no endémicos.

Por ello, diferentes laboratorios están trabajando en el desarrollo de vacunas de nueva generación basadas en proteínas recombinantes, partículas similares a virus (VLPs), vectores virales recombinantes y vacunas ADN. El objetivo deseable sería obtener vacunas seguras, capaces de inducir una respuesta inmunitaria rápida y duradera idealmente tras la administración de una única dosis. Al mismo tiempo, el empleo de estas vacunas debería permitir diferenciar los animales infectados de los vacunados (DIVA), además de ser estables, económicas, y de uso tanto humano como veterinario.

El objetivo principal de este trabajo se ha centrado en la evaluación de la eficacia vacunal de construcciones recombinantes basadas en plásmidos ADN y virus Vaccinia modificado de la cepa Ankara (MVA) que expresan antígenos del virus de la fiebre del Valle del Rift, tanto en el modelo murino como ovino.

A partir de las construcciones de ADN plasmídico, se construyeron los vectores virales MVA recombinantes codificando las glicoproteínas Gn y Gc (MVA-GnGc), y la nucleoproteína viral N (MVA-N) de MP12 RVFV. Una vez se confirmó la correcta inserción genética y expresión de las proteínas de interés, se procedió al estudio de la respuesta inmune y protección inducida en un modelo de infección experimental de ratones BALB/c. La protección alcanzada con dos dosis de ADN codificando las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV (pCMV-M4) fue de un 72%. En contra de lo esperado, la vacunación heteróloga basada en un primado con ADN y un recuerdo con MVA (pCMV-M4 + MVA-GnGc) no mejoró los resultados en cuanto a supervivencia aunque logró disminuir la morbilidad del 72% al 29% con respecto a los animales inmunizados con la vacunación homóloga basada en ADN. Sin embargo, una dosis de MVA-GnGc fue capaz de conferir una protección completa en ausencia de signos clínicos tras el desafío con la cepa virulenta RVFV 56/74, dato que se reproducía tras el empleo de una dosis combinada de MVA-GnGc + MVA-N. Cuando se analizó la respuesta humoral previa al desafío en los animales inmunizados con vacunas codificando las glicoproteínas virales, solo se observaron niveles moderados de anticuerpos neutralizantes sin superar el límite de detección del ensayo, algo que no explicaba suficientemente el nivel de protección observado.

Para analizar el posible papel de una respuesta inmunitaria celular de tipo citotóxico, se decidió sintetizar una colección de péptidos de 9 aminoácidos pertenecientes a la secuencia de las glicoproteínas GnGc de MP12 RVFV con una mayor probabilidad de unión al Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I de ratón de haplotipo H2-K(D)<sup>d</sup>, de acuerdo con una predicción bioinformática (*immunoepitope.org*). Se identificaron tres epítomos, uno perteneciente a la glicoproteína Gn y dos correspondientes a la glicoproteína Gc de RVFV, mediante ensayos de respuesta celular. En estos experimentos se demostró la capacidad de estos tres péptidos para inducir secreción de interferón (IFN)- $\gamma$  en

linfocitos esplénicos de animales vacunados, específico de una población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Estos datos en su conjunto sugieren que la alta protección observada en los ratones inmunizados con MVA-GnGc se debe a una respuesta de tipo celular en ausencia de anticuerpos neutralizantes.

En un experimento posterior se estudió la protección conferida por la vacuna MVA-GnGc en ratones 129Sv/Ev IFNAR<sup>-/-</sup> inmunodeficientes para el receptor IFN- $\alpha/\beta$ , donde se observó que los animales no se protegían tras el desafío con RVFV. Sin embargo, animales inmunocompetentes con el mismo fondo genético mostraron altos niveles de supervivencia. Con este resultado se demostró la importancia de una respuesta funcional a la inducción de IFN de tipo I en el hospedador, posiblemente para el desarrollo de una respuesta inmune adquirida eficaz mediada por el vector viral recombinante MVA-GnGc.

Con el fin de estudiar la implicación de cada glicoproteína de RVFV en la inmunogenicidad del vector MVA se realizaron ensayos de protección y respuesta inmune en ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt. Teniendo en cuenta que la inducción de anticuerpos neutralizantes frente al RVFV tras una infección se asocia a la glicoproteína Gn, la mayor protección observada en ratones BALB/c inmunizados con una dosis de MVA-Gc con respecto a los animales inmunizados con MVA-Gn, confirma que es posible obtener protección estimulando una respuesta celular específica de Gc en ausencia de anticuerpos neutralizantes en el modelo de ratón.

Por otro lado, la inmunización de ratones BALB/c con dos dosis de vacuna ADN codificando la nucleoproteína N de RVFV (pCMV-N) consiguió una protección parcial del 58% tras el desafío viral, con signos clínicos en el 43% de los animales. Cuando se comparó con la estrategia heteróloga pCMV-N + MVA-N se observó un aumento no significativo de la supervivencia hasta el 72%, incrementándose también la morbilidad al 86%. A diferencia de lo observado con MVA-GnGc, la vacunación con una dosis de MVA-N no fue capaz de proteger a los animales tras el desafío, obteniéndose únicamente un retraso en cuanto a la mortalidad y a la aparición de signos clínicos con respecto a los animales no vacunados. Dicha protección se incrementó hasta el 60% en aquellos animales inmunizados con dos dosis de MVA-N, aunque con presencia de signos clínicos en

todos ellos. En este experimento la detección de altos títulos de anticuerpos no neutralizantes frente a la nucleoproteína viral se correspondía con la presencia de una protección parcial, lo que sugiere que estos anticuerpos podrían tener un papel significativo tras la infección. Con respecto al estudio de la respuesta celular, ninguno de los péptidos de la nucleoproteína N seleccionados mediante predicción bioinformática fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$  en estos ensayos.

Una vez analizada la respuesta inmunitaria y protección inducida por las diferentes estrategias vacunales empleadas en el modelo murino, se concluyó que la vacuna MVA-GnGc podía ser considerada un candidato vacunal potencial para uso veterinario frente a RVFV. Para su valoración, se emplearon corderos de 5-7 semanas de edad de raza europea en un modelo de infección experimental caracterizado previamente. Se formaron tres grupos de animales; un grupo inmunizado con MVA-GnGc, un grupo control vacunado con MVA-GFP y otro grupo control no vacunado. Una vez inmunizados los animales con una dosis vía subcutánea, todos los animales fueron desafiados a los 14 días post-inmunización con el aislado virulento RVFV 56/74.

Tras el desafío todos los animales presentaron signos clínicos de enfermedad evidentes y dos corderos no sobrevivieron (un animal del grupo MVA-GnGc y otro animal del grupo vacunado control). A pesar de ello, se observaron ciertos efectos protectores en los animales vacunados con MVA-GnGc como un retraso de 24 horas en la detección del pico de fiebre y una menor duración del mismo con respecto a ambos grupos controles. En este trabajo fueron detectados niveles similares de ARN viral y virus infeccioso en sangre a día 3 post-infección en todos los grupos, pero quedó demostrada la capacidad que tenía MVA-GnGc en ovejas para disminuir la duración de la viremia y la carga viral detectada en secreciones nasales y bucales. Por último, no se detectaron anticuerpos neutralizantes tras la inmunización con MVA-GnGc a excepción de un animal, pero sí se observó un rápido incremento de éstos tras el desafío indicativo de un posible efecto de primado de la vacuna, junto a una elevada producción de anticuerpos anti-N con respecto a ambos grupos controles.

Estos datos indican que una dosis de la vacuna MVA-GnGc puede ser suficiente para reducir la secreción de RVFV y la duración de la viremia, pero no proporciona una inmunidad esterilizante ni protección completa frente a la enfermedad en corderos. Todo ello justifica seguir avanzando en la optimización de esta estrategia de vacunación para mejorar su eficacia en el modelo ovino, que permitan el estudio de los mecanismos implicados en la protección de la enfermedad y contribuyan al desarrollo de estrategias de control y prevención más efectivas.





## **II SUMMARY**



Rift Valley fever virus (RVFV) is a zoonotic pathogen which affects different ruminant species and human. This is an arbovirus classified within *Bunyaviridae* family and *Phlebovirus* genus it can mainly be transmitted by bite of infected mosquitoes, as well as by direct contact with body fluids from viremic animals and inhalation of aerosols.

The disease caused by this pathogen, Rift Valley fever (RVF), is endemic in sub-Saharan Africa, Egypt and Saudi Arabia. In the sub-equatorial Africa outbreaks are cyclics and are linked to heavy rainfall that allow the establishment of mosquito breeding areas. In addition, the risk of virus introduction to disease-free areas such as Europe or America could be increased by phenomena associated with climate change as well as the rise in international trade of animals. This circumstances together the wide host range of the virus and high vector competence that have numerous mosquito species, could facilitate the outbreaks of the disease with unpredictable consequences for public and animal health.

The vaccination is the only effective strategy for the control and prevention of this disease. However, currently available vaccines are based on attenuated or inactivated virus, and present various adverse effects such as teratogenicity, abortions or low immunogenicity respectively so that none of them has been approved for human or livestock use in non-endemic countries.

For this reason, several laboratories are working on the development of new generation vaccines based on recombinant proteins, Virus-Like Particles (VLPs), recombinant viral vectors and DNA-based vaccines. The desirable objective would be to obtain safe vaccines capable of inducing a rapid and long-lasting immune response ideally after administration of a single dose. At the same time, the use of these vaccines should allow Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA), besides being stable, inexpensive, and both human and veterinary use.

The main objective of this work has focused on the evaluation of vaccine efficacy of recombinant constructs based on plasmid DNA and modified vaccinia virus Ankara (MVA) strain expressing antigens of Rift Valley fever virus, both mouse and sheep model.

From plasmid DNA constructs, recombinant MVA viral vectors encoding the glycoproteins Gn and Gc (MVA-GnGc) and the viral nucleoprotein N (MVA-N) of RVFV MP12 were constructed. Once the correct genetic insertion and expression of proteins of interest was confirmed, proceeded to study immune response and protection induced in an experimental infection model of BALB/c mice. The protection achieved with two doses of DNA encoding the RVFV glycoproteins Gn and Gc (pCMV-M4) was 72%. Opposed to expectations, the heterologous vaccination based on a primed with DNA and boost with MVA (pCMV-M4 + MVA-GnGc) did not improve the results in terms of survival even though achieved decrease the morbidity from 72% to 29% compared to animals immunized with DNA-based homologous vaccination. However, a single dose of MVA-GnGc was able to confer complete protection in the absence of clinical signs after challenge with virulent strain RVFV 56/74, a fact that was confirmed with the use of a combined dose of MVA-GnGc + MVA-N. When the humoral response previous challenge was analyzed in the animals immunized with vaccines encoding the viral glycoproteins, only moderate levels of neutralizing antibodies were observed not to exceed the detection limit of the assay, which did not sufficiently explain the level of protection observed.

To analyze the possible role of a cellular immune response of cytotoxic type, it was decided to synthesize a collection of 9-mer peptides belonging to the RVFV-MP12 GnGc glycoproteins sequence with a higher probability of binding to class-I Major Histocompatibility Complex (MHC) restricted H2-K(D)<sup>d</sup> mouse according to a bioinformatic prediction (*immunoepitope.org*). By cell-mediated response assays three epitopes were identified, one belonging to the glycoprotein Gn and two corresponding to the glycoprotein Gc of RVFV. In these experiments the ability of these three peptides to induce interferon (IFN)- $\gamma$  secretion in spleen cells of vaccinated animals were showed, specific for a population of CD8<sup>+</sup> T cells. Together, these data suggest that high protection observed in mice immunized with MVA-GnGc is due to a cell-type response in the absence of neutralizing antibodies.

In a subsequent experiment we studied the protection conferred by the vaccine MVA-GnGc in 129Sv/Ev IFNAR<sup>-/-</sup> immunodeficient mice lacking the IFN- $\alpha/\beta$

receptor, where it was observed that animals were not protected after RVFV challenge. However, immunocompetent animals with the same genetic background exhibited high levels of survival. With this result it was demonstrated the importance of a functional response to the induction of type-I IFN in the host, likely to the development of an effective acquired immune response mediated for recombinant viral vector MVA-GnGc.

To study the involvement of each RVFV glycoprotein in MVA vector immunogenicity were performed protection and immune response assays in BALB/c and 129Sv/Ev wt mice. Given that the induction of neutralizing antibodies against RVFV following infection is associated glycoprotein Gn, the high protection observed in BALB/c mice immunized with a single dose of MVA-Gc compared to animals immunized with MVA-Gn, confirms that it is possible to obtain protection by stimulating a specific cellular response of Gc in the absence of neutralizing antibodies in the mouse model.

On the other hand, BALB/c mice immunized with two doses of DNA vaccine encoding the nucleoprotein N of RVFV (pCMV-N) achieved partial protection of 58% after viral challenge, with clinical signs in 43% of animals. When it was compared with the heterologous regimen pCMV-N + MVA-N no significant improve in survival to 72% was observed, also increasing morbidity to 86%. Unlike what was observed with MVA-GnGc, the immunization with a single dose of MVA-N was not able to protect the animals after challenge, showing only a delay in terms of mortality and clinical signs compared to unvaccinated animals. This protection was increased to 60% in those animals immunized with two doses of MVA-N, although clinical signs were detected in all. In this experiment, detection of high titers of non-neutralizing antibodies against viral nucleoprotein corresponded to the presence of a partial protection, suggesting that these antibodies may play a significant role after infection. Regarding the study of cellular response none of the nucleoprotein N peptides selected by bioinformatics prediction were able to stimulate the secretion of IFN- $\gamma$  in this assays.

After analyzing the immune response and protection induced by different vaccine strategies used in the mouse model, it was concluded that the vaccine MVA-

GnGc could be considered a potential candidate vaccine for veterinary use against RVFV. For its assessment, lambs of European breed aged 5–7 weeks were used in an experimental model of infection previously characterized. Three groups of animals were formed: one group immunized with MVA-GnGc, one vector control group vaccinated with MVA-GFP and another control group non-vaccinated. Once the animals were immunized with a single dose subcutaneously, all animals were challenged at 14 days post-immunization with virulent isolate RVFV 56/74.

Following challenge, all animals showed clinical signs of apparent disease and two lambs (one from the MVA-GnGc group and another from the vector control group) succumbed. Despite that, certain protective effects were observed in animals vaccinated with MVA-GnGc as a 24 hour delay in detecting the peak of pyrexia and a reduced length of the same with respect to both control groups. In this work similar levels of viral RNA and infectious virus in blood at day 3 post-infection in all groups were detected, but he demonstrated the ability of MVA-GnGc in sheep to decrease the duration of viremia and viral load detected in nasal and oral secretions. Finally, no neutralizing antibodies were detected following immunization with MVA-GnGc except for one animal, but it was observed a rapid increase after challenge indicative of a possible priming effect of the vaccine, with a high production of anti-N antibodies regarding both control groups.

These data indicate that a single dose of the MVA-GnGc vaccine may be sufficient to reduce RVFV shedding and duration of viremia but does not provide sterile immunity nor complete protection against the disease in lambs. All this justifies further progress in the optimization of this vaccination strategy to improve the efficacy in the sheep model, allowing the study of the mechanisms involved in disease protection and the development of control and prevention strategies more effective.

## **III INTRODUCCIÓN**





## **1 EL VIRUS DE LA FIEBRE DEL VALLE DEL RIFT (RVFV) Y LA ENFERMEDAD.**

La fiebre del Valle del Rift (RVF) es una enfermedad zoonótica transmitida por un virus que pertenece a la familia *Bunyaviridae* género *Phlebovirus*. Afecta principalmente a rumiantes causando abortos en hembras gestantes y alta mortalidad en animales neonatos. En el hombre, produce síntomas leves que en el 1-2% de los casos evoluciona a hepatitis, encefalitis, fiebre hemorrágica y retinitis, llegando a causar la muerte en el 10-20% de estos casos.

El virus puede transmitirse a través de mosquitos, contacto directo con fluidos de animales virémicos o aerosoles. Los brotes de RVF son cíclicos, y están asociados a fuertes lluvias tras largos períodos de sequías. Estas condiciones favorecen la cría y el establecimiento de las poblaciones de mosquitos que transmiten el virus entre los diversos hospedadores susceptibles. La enfermedad es endémica en el África sub-sahariana, Egipto y Arabia Saudí, aunque existe riesgo de distribución del virus a zonas libres de enfermedad. Por ello, RVFV está considerado como un patógeno zoonótico emergente/re-emergente clasificado como un agente de Nivel de Bioseguridad (BSL)-3 en Europa y un agente BSL-3Ag en Estados Unidos, además de ser un agente potencial de bioterrorismo (Bouloy and Flick 2009).

### **1.1 Historia y distribución geográfica.**

La fiebre del Valle del Rift fue descrita por primera vez en el año 1931 tras el brote que tuvo lugar en una granja cercana al lago Naivasha en el Valle del Rift (Kenia), y que dio nombre al virus (Daubney 1931). Aunque es probable que éste existiera antes, al describirse brotes de una enfermedad de origen desconocido que causaba muertes en corderos y ovejas desde el año 1912 en esta zona (Easterday 1965).

La enfermedad estuvo confinada en la región oriental del Valle del Rift hasta la aparición del brote de 1950/51 en Sudáfrica. La enfermedad causó 100.000 muertes y 500.000 abortos en ovejas, y el agente no fue identificado hasta el desarrollo de la enfermedad en el personal expuesto a los animales infectados

(Mundel and Gear 1951). Posteriormente, tuvieron lugar brotes de la enfermedad en países sub-saharianos como Zimbawe, Zambia y Mozambique, limitándose la enfermedad al ganado vacuno y ovino de origen europeo (Dautu, Sindato et al. 2012).

En el año 1977 el virus fue aislado por primera vez en Egipto donde originó la mayor epidemia-epizootía. El brote causó 200.000 infecciones en humanos y al menos 594 muertes, junto a grandes pérdidas económicas en el ganado. La gran mortalidad y morbilidad observada en humanos durante este brote no había sido descrito anteriormente. Su introducción en Egipto fue probablemente debida a la importación de animales infectados desde Sudán (Johnson, Chanas et al. 1978). Posteriormente, tuvieron lugar más brotes en los años 1993, 1994, 1997 y 2003, que causaron muertes en el ganado aunque con un menor número de infecciones en humanos, considerándose por tanto la enfermedad endémica en este país (Ahmed Kamal 2011).

En 1987, la enfermedad se extendió por primera vez hacia el oeste de África detectándose en Mauritania y Senegal, aunque previamente el virus ya había sido aislado en esta zona en el año 1974. La aparición del brote coincidió con la construcción de la presa de Diama en el río Senegal que favoreció la cría de mosquitos y la transmisión de la enfermedad. A diferencia de los países del África sub-sahariana, en los países del norte y oeste de África los brotes no están relacionados con la presencia de fuertes lluvias, sino que surgen asociados a grandes ríos y a la construcción de presas (Saluzzo, Digoutte et al. 1987).

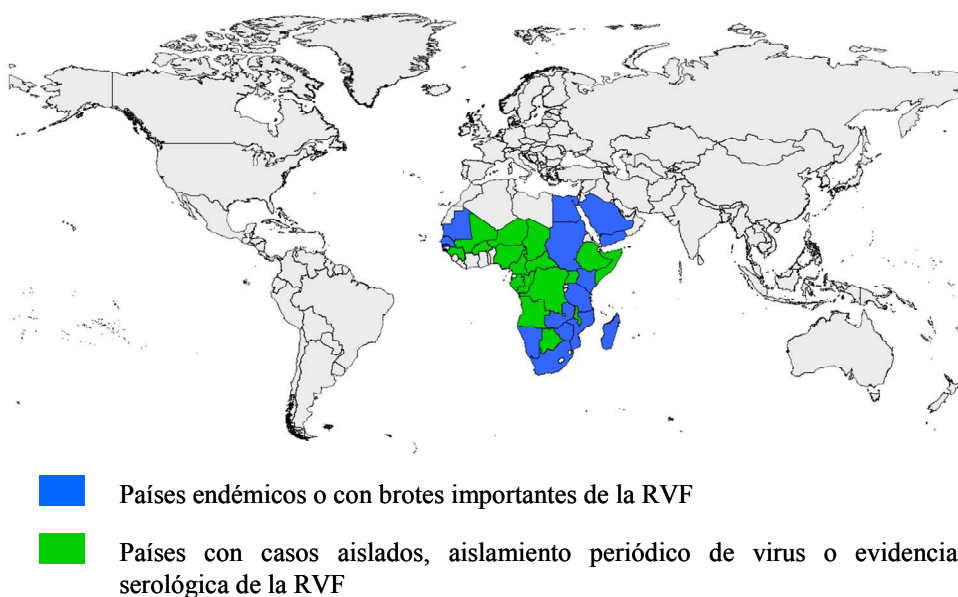
Uno de los brotes más graves de RVF fue el que tuvo lugar en Kenia en el año 1997/98 asociado a las inundaciones producidas por el fenómeno climático de El Niño. La enfermedad afectó a 89000 personas con 478 muertes, junto a un número elevado de animales muertos que se incrementó debido a la presencia simultánea de la enfermedad de la Lengua Azul (Rep 1998)

En el año 2000, la enfermedad apareció por primera vez fuera de África, en Arabia Saudí y Yemen simultáneamente, donde causó 2000 infecciones en humanos y 245 muertes además de una alta mortalidad en el ganado ovino y caprino (Ahmad 2000). De nuevo, la causa del brote se debió a la importación de animales infectados

procedentes del Este de África. A su vez, las fuertes lluvias y la temperatura adecuada favoreció la presencia del vector dando lugar a la aparición de la enfermedad (Jup, Kemp et al. 2002).

Los brotes más recientes se han localizado en el Este de África en el año 2006/07, con 698 muertos y pérdidas en el ganado en Somalia, Kenia y Tanzania (Bird, Ksiazek et al. 2009), así como en Sudáfrica en 2010. Además, RVF se ha detectado fuera del continente africano, concretamente en Madagascar (Andriamandimby, Randrianarivo-Solofoniaina et al. 2010), Comoros (Roger, Girard et al. 2011) y la isla francesa de Mayotte (Sissoko, Giry et al. 2009).

Actualmente, la enfermedad se considera endémica en Gambia, Senegal, Mauritania, Namibia, Sudáfrica, Mozambique, Zimbabwe, Zambia, Kenia, Tanzania, Sudán, Egipto, Madagascar, Arabia Saudí y Yemen. Los países que han presentado casos aislados, aislamiento periódico de virus o evidencia serológica de RVF han sido: Botswana, Angola, República Democrática del Congo, Congo, Gabon, Camerún, Nigeria, República Central Africana, Chad, Níger, Burkina Faso, Mali, Guinea, Malawi, Uganda, Etiopía y Somalia (www.cdc.gov) (Fig. 1).



**Figura 1.** Mapa de distribución de la RVF. Adaptado de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).

## 1.2 Transmisión de la enfermedad.

La transmisión del RVFV a humanos y animales se realiza mediante la picadura de mosquitos infectados. También, existe riesgo de contagio al hombre al manipular tejidos procedentes de animales virémicos, así como por la inhalación de aerosoles y la ingestión de leche cruda (Gerdes 2004; Bouloy and Flick 2009).

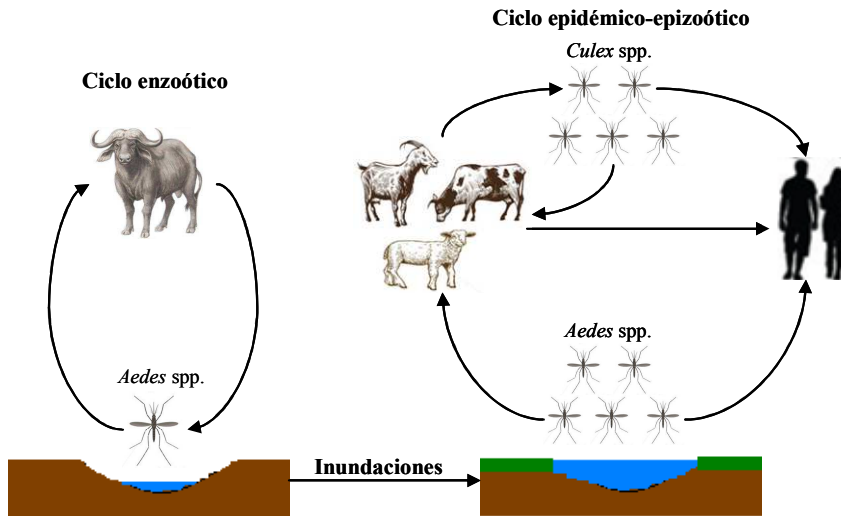
El RVFV ha sido aislado en más de 30 especies de mosquitos. El principal vector de la enfermedad son los mosquitos pertenecientes al género *Aedes*, ya que actúan como reservorios y permiten el mantenimiento del virus en la naturaleza. Una vez establecida la enfermedad, diferentes especies del género *Culex* y de los géneros *Anopheles*, *Eretmapodites*, *Mansonia*, y *Coquillettidia* se encargan de amplificar y distribuir el virus entre los diferentes hospedadores dando lugar a un brote de la enfermedad (Pepin, Bouloy et al. 2010).

Por otra parte, se ha aislado virus en *Culicoides*, *Simulium* (moscas negras) y *Amblyomma* (garrapatas) que permiten una transmisión mecánica del virus (Hoch, Gargan et al. 1985). Asimismo, se han realizado estudios de susceptibilidad y transmisión del RVFV en especies de flebótomos (*Phlebotomus*, moscas de la arena) (Hoch, Turell et al. 1984), así como en diferentes especies de garrapatas de los géneros *Hyalomma* y *Rhipicephalus* donde se ha observado replicación viral y capacidad de transmisión viral al hospedador (Linthicum, Logan et al. 1989).

Como se ha mencionado anteriormente, la aparición de la RVF está muy relacionada con la presencia de agua y el establecimiento de zonas de cría de mosquitos. Los brotes epidémicos/epizoóticos más importantes han ocurrido en el Cuerno de África tras las inundaciones asociadas al fenómeno de El Niño en 1997/98, y después de las construcciones de las presas de Aswan en Egipto en 1977 y la presa de Diama en el río Senegal en 1987. Las epizootías de RVF son cíclicas en la naturaleza y están caracterizadas por largos períodos inter-epizoóticos. Éstos oscilan entre 5-15 años en las regiones húmedas del Sur y Este de África donde los brotes están asociados a fuertes lluvias. Mientras que en las regiones secas del Norte y Oeste de África los brotes surgen cada 15-30 años relacionados con la presencia de campos de regadío y la construcción de presas (Gerdes 2004).

Durante los períodos inter-epizoóticos el virus se mantiene en la naturaleza mediante transmisión transovárica en mosquitos, como se ha demostrado para *Aedes (Neomelaniconion) lineatopennis* en Kenia y *Aedes (Aedimorphus) vexans* en Senegal. Los huevos de estas especies son muy resistentes a la sequía y pueden durar años enterrados en depresiones de terreno (conocidas como dambos) hasta su eclosión con una nueva época de lluvias (Zeller, Fontenille et al. 1997). En primer lugar, emergen mosquitos del género *Aedes* infectados con el RVFV. A estas zonas inundadas se acercan los animales a beber, y es aquí donde se produce el contacto entre el mosquito y el animal. A los pocos días, los animales infectados desarrollan altos títulos de viremia en sangre. A continuación, aparecen otras especies de mosquitos, pertenecientes al género *Culex* entre otros, que se multiplican en las zonas inundadas. Estos mosquitos actúan como vectores amplificando y distribuyendo el virus entre animales y personas, dando lugar a un brote epidémico/epizoótico (Fig. 2). La probabilidad de transmisión al hombre aumenta al incrementarse la población de mosquitos infectados, además de la posible infección mediante contacto directo y aerosoles durante el manejo de animales virémicos. A lo largo del ciclo enzoótico, los mosquitos infectan de forma ocasional a animales silvestres y domésticos donde se amplifica el virus.

La existencia de reservorios vertebrados en la naturaleza que permitan el mantenimiento del virus entre los diferentes brotes es aún poco conocida (Olive, Goodman et al. 2012). Por una parte, se ha detectado presencia de anticuerpos (Ac) frente al RVFV en pequeños roedores de la especie *Aethomys namaquensis* durante el período interepizootico de 1986-1990 en Sudáfrica (Pretorius, Oelofsen et al. 1997). Además, se ha logrado aislar virus en la especie *Rattus rattus* durante el brote ocurrido en Egipto durante el año 1977 (Imam, El-Karamany et al. 1979), lo que indicaría el posible papel de estos animales en el mantenimiento del patógeno. Por otra parte, la implicación de los murciélagos en el ciclo de RVF es controvertida, ya que diferentes estudios epidemiológicos no han detectado Ac en suero. Sin embargo, si se ha aislado virus en las especies de murciélago *Micropteropus pusillus* y *Hipposideros abae*, observándose susceptibilidad de las mismas tras una infección experimental (Boiro, Konstaninov et al. 1987; Oelofsen and Van der Ryst 1999).



**Figura 2.** Representación esquemática del ciclo enzoótico y epidémico-epizoótico del RVFV.

La compleja relación de lluvias, mosquitos, transmisión transovárica y presencia de hospedadores no expuestos previamente al virus influye en el desarrollo de un brote epidémico/epizoótico o en la estabilidad de un ciclo enzoótico. La evolución hacia el brote es multifactorial y necesita de todos los factores detallados anteriormente en su conjunto. Por otra parte, los brotes de la RVF pueden llegar a ser de gran gravedad en países no endémicos debido a que la infección en hospedadores que no han estado expuestos previamente al virus, junto con la presencia de un número elevado de vectores, produce una mayor letalidad de la enfermedad causando graves epidemias/epizootías. Además, el establecimiento de la enfermedad en otros continentes como Europa y América sería posible, ya que se ha demostrado mediante estudios experimentales una competencia vectorial alta para el RVFV entre las especies de mosquitos existentes en estas zonas (Gargan, Clark et al. 1988; Turell, Bailey et al. 1988; Chevalier, Pepin et al. 2010).

### 1.3 Clasificación taxonómica del RVFV.

El RVFV pertenece a la familia *Bunyaviridae* y está clasificado dentro del género *Phlebovirus*. La familia *Bunyaviridae* está comprendida por cuatro géneros de virus que infectan animales (género *Orthobunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*) y un género que infecta plantas (género *Tospovirus*) (van Regenmortel, Mayo et al. 2000). La transmisión de estos virus se realiza a través de artrópodos e incluyen mosquitos, garrapatas, moscas de arena y tisanópteros, a excepción del género *Hantavirus* cuyo vector son los roedores. La familia *Bunyaviridae* incluye un gran grupo de virus que comparten características morfológicas, morfogénicas y antigénicas (Walter and Barr 2011). Algunos miembros de la familia están asociados a infecciones graves o mortales en el hombre como el RVFV, el virus Hantaan, el virus de la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo y el virus de la enfermedad de La Crosse. Los miembros más representativos de cada género se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Familia *Bunyaviridae* donde el virus tipo de cada género aparece subrayado.

Género	Hospedador	Vector	Especie
<i>Orthobunyavirus</i>	Vertebrados	Artrópodos	<u>Bunyamwera virus (BUNV)</u> La Crosse virus (LACV)
<i>Nairovirus</i>	Vertebrados	Artrópodos	<u>Nairobi sheep disease virus (NSD)</u> Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) Dugbe virus (DUGV)
<i>Phlebovirus</i>	Vertebrados	Artrópodos	<u>Rift Valley fever virus (RVFV)</u> Punta toro virus (PTV) Toscana virus (TOSV) Uukuniemi virus (UUKV)
<i>Hantavirus</i>	Vertebrados	Roedores	<u>Hantaan virus (HTNV)</u> Puumala virus (PUUV)
<i>Tospovirus</i>	Plantas	Artrópodos	<u>Tomato spotted wilt virus (TSWV)</u>



El género *Phlebovirus* debe su nombre a los *Phlebotomine sandflies* o “moscas de la arena” que están implicados en la transmisión del virus. Como excepción, el RVFV se transmite mediante mosquitos, y los virus pertenecientes al grupo *Uukuniemi* a través de garrapatas del género *Ixodes*.

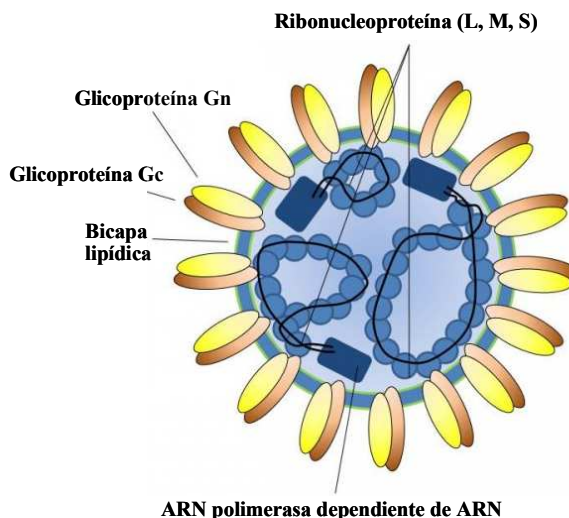
Entre los *Phlebovirus* de gran importancia para la salud pública se encuentran el virus de la fiebre de las moscas de la arena de Sicilia (SFSV), el virus de la fiebre de las moscas de la arena de Nápoles (SFNV) y el virus Punta Toro (PTV), que producen en el hombre síntomas leves como fiebre, dolor de cabeza y mialgia, mientras la enfermedad puede ser más grave evolucionando a meningoencefalitis en el caso del virus Toscana (TOSV), o incluso la muerte tras la infección con el RVFV (Xu, Chen et al. 2007).

#### **1.4 Morfología, estructura y genoma del RVFV.**

Es un virus esférico con un tamaño de 90-100 nm de diámetro, posee una envuelta formada por una bicapa lipídica procedente de la célula y carece de proteína de matriz. El genoma viral de 12 kb está formado por tres segmentos genómicos de ARN de polaridad negativa y cadena sencilla, denominados L (“*Large*”, grande), M (“*Medium*”, mediano) y S (“*Small*”, pequeño).

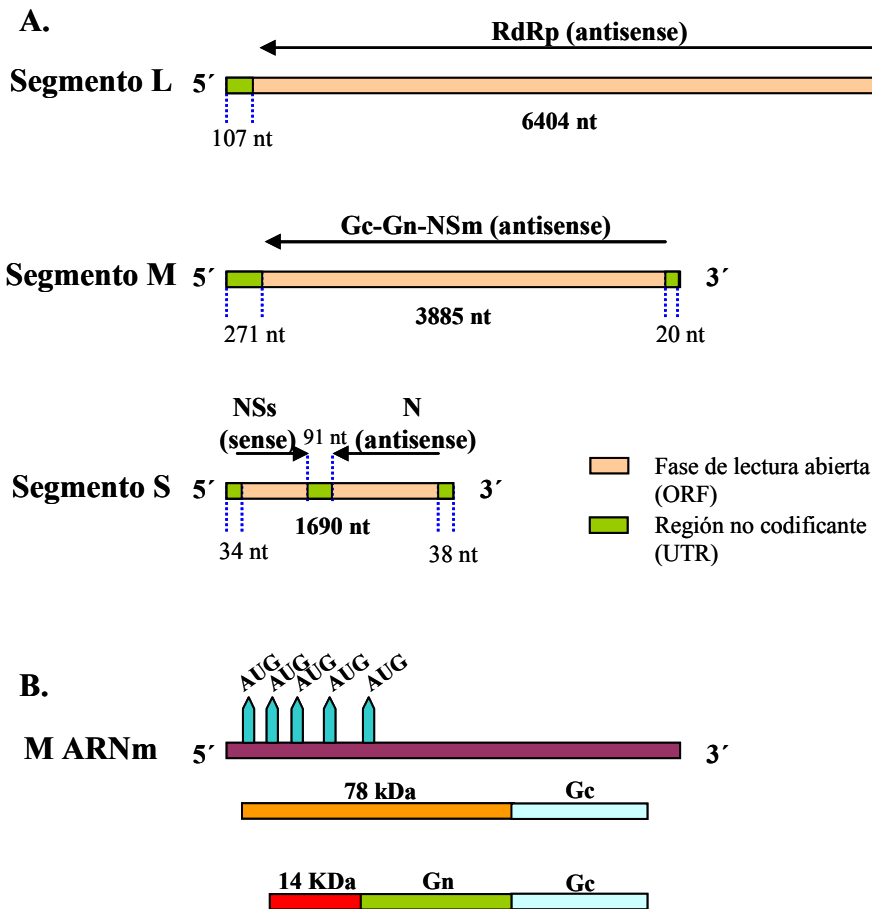
El virión está compuesto por cuatro proteínas estructurales: las glicoproteínas Gn y Gc, la nucleoproteína N, y la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp), como se muestra en la Figura 3. En su interior se encuentran la nucleoproteína N y la RdRp asociadas al genoma viral dando lugar a las ribonucleoproteínas (RNPs).

Las glicoproteínas Gn y Gc se encuentran asociadas en la superficie del virus formando espículas que se agrupan en capsómeros. La superficie del virus está formada por 112 capsómeros que se ensamblan formando una red con simetría icosaédrica (Freiberg, Sherman et al. 2008).



**Figura 3.** Estructura del virión de la familia Bunyaviridae. Adaptado de [www.bunyavirus.org](http://www.bunyavirus.org).

Cada uno de los segmentos genómicos presenta en sus extremos 5' y 3' terminales regiones no codificantes (UTRs) específicas de cada segmento (Fig. 4), que sirven de promotor para la transcripción y replicación mediada por la polimerasa viral (Bouloy and Weber 2010). Los extremos de cada segmento son complementarios entre sí, permitiendo el apareamiento de bases de forma no covalente y la formación de estructuras en horquilla (Pardigon, Vialat et al. 1982), adquiriendo así el ARN una forma circular (Pettersson and von Bonsdorff 1975). Recientemente, se ha descrito la importancia la región 5'UTRs del segmento M para el empaquetamiento de los tres segmentos genómicos del virus, sugiriéndose además la presencia de interacciones intermoleculares específicas entre los tres segmentos para la obtención del virus (Terasaki, Murakami et al. 2011).



**Figura 4.** Organización genómica del RVFV. (A) Representación esquemática del genoma de RVFV donde se indica el tamaño de las regiones codificantes, así como los extremos no codificantes (UTRs). (B) Esquema del ARNm transcrito del segmento M del RVFV con los cinco codones de iniciación AUG en fase en el extremo 5' terminal, y las proteínas expresadas desde el primer y segundo codón de iniciación AUG.

El segmento L con una única fase de lectura abierta (ORF) codifica en un sentido antigenómico la RdRp (Muller, Poch et al. 1994). La RdRp es la proteína de mayor tamaño con 237 kDa y forma oligómeros de gran importancia para la realización de sus funciones (Zamoto-Niikura, Terasaki et al. 2009) como son la replicación y transcripción del genoma viral junto a la nucleoproteína (Lopez, Muller et al. 1995), y actividad endonucleasa (Reguera, Weber et al. 2010).

El segmento M presenta un único ORF y cinco codones de iniciación AUG, codificando en un sentido antigenómico la poliproteína precursora que por proteólisis se procesa en dos proteínas no estructurales de 78 kDa y 14 kDa (NSm), y las glicoproteínas Gn y Gc (Collett, Purchio et al. 1985). El virus puede utilizar el primer codón de iniciación dando lugar a las proteínas 78 kDa, que incluye la secuencia de la proteína Gn, y Gc. Si la lectura se inicia en el segundo codón de iniciación, se generan las proteínas de 14 kDa o NSm, la Gn y la Gc (Pepin, Bouloy et al. 2010). Las glicoproteínas Gn y Gc son responsables del reconocimiento y unión al receptor celular, presentan capacidad hemaglutinante e inducen una respuesta inmunitaria protectora en el hospedador mediada por Ac neutralizantes. La glicoproteína Gn (54 kDa) está localizada cerca de la región N terminal del segmento M y presenta un dominio de localización en el aparato de Golgi, mientras que la glicoproteína Gc (59 kDa) está localizada en la región C terminal y presenta una señal de retención en el retículo endoplásmico. Al igual que en otros bunyavirus, Gc es transportada al aparato de Golgi mediante su unión física con Gn, donde ambas proteínas son glicosiladas (Gerrard and Nichol 2002). Se ha sugerido que la Gc del RVFV interacciona con las RNPs y es la responsable del empaquetamiento del genoma y del *budding* viral en el aparato de Golgi, como ya se ha descrito para otros miembros del género *Phlebovirus* (Overby, Pettersson et al. 2007). Las proteínas no estructurales 78 kDa y 14 kDa son dispensables para la maduración, replicación e infección viral (Gerrard, Bird et al. 2007). A pesar de que ambas proteínas no son esenciales para el crecimiento viral, tienen una gran importancia en la supervivencia del virus y/o en el establecimiento de la infección viral en el hospedador (Won, Ikegami et al. 2006). La delección de ambas proteínas en la cepa atenuada MP12 induce placas de lisis más grandes con respecto a la cepa parental, y una mayor apoptosis debido al incremento de la actividad de las caspasas. Sin embargo, esta función antiapoptótica no se ha observado en la cepa virulenta ZH501 (Gerrard, Bird et al. 2007; Won, Ikegami et al. 2007). Por otra parte, se ha descrito recientemente que la proteína de 78 kDa forma parte del virión cuando este es producido en células de insecto C6/36, mientras que no es detectada en virus propagados en células de mamífero. Se sugiere que esta proteína facilita la

transmisión del virus desde el mosquito a las diferentes especies de hospedadores, junto a un posible papel durante la replicación en el insecto (Weingartl, Zhang et al. 2014). Por todo ello, se están estudiando actualmente las diferentes funciones de ambas proteínas no estructurales incluyéndolo su posible papel en la transmisión de la enfermedad.

El segmento S presenta dos ORF separados por una región no codificante. El virus emplea una estrategia ambisentido, y codifica en sentido antigenómico la nucleoproteína N y en sentido genómico la proteína no estructural NSs (Giorgi, Accardi et al. 1991). La nucleoproteína N es una proteína estructural de 27 kDa y, junto con la RdRp, es indispensable para la replicación y transcripción viral, así como para el empaquetamiento del ARN. Esta proteína es la más abundante en el virión y tiene un papel importante en la protección del ARN viral al que envuelve. Recientemente se ha confirmado por cristalografía la organización de la N en forma de anillo hexamérico con un sitio de unión al ARN (Ferron, Li et al. 2011). La N es una proteína altamente inmunogénica e induce títulos elevados de Ac tanto en animales infectados natural como experimentalmente. Por ello, es la proteína de elección a la hora de diseñar ensayos de diagnóstico frente a RVFV. La proteína no estructural NSs (31kDa) es el principal factor de virulencia. Posee tropismo nuclear, donde forma estructuras filamentosas e interacciona con diferentes proteínas de la célula (Swanepoel and Blackburn 1977). Tras la infección, se produce una fuerte disminución de la actividad transcripcional celular debido a la unión de la NSs con la proteína p44 del factor de transcripción basal TFIID (Le May, Dubaele et al. 2004). Además, se inhibe de forma específica la activación del promotor de interferón (IFN)- $\beta$  en la célula (Le May, Mansuroglu et al. 2008), y se degrada a un nivel post-traducciona la proteína-kinasa dependiente de ds-ARN (PKR) dando lugar a un aumento de la síntesis de proteínas virales (Habjan, Pichlmair et al. 2009; Ikegami, Narayanan et al. 2009).

El RVFV presenta un único serotipo, y existen, según análisis filogenéticos, tres linajes principales asociados al lugar de origen de la infección: Oeste de África, Este/Central África y Egipto (Sall, Zanotto et al. 1999). Dentro de estos linajes, se

pueden encontrar cepas de distinta procedencia lo que sugiere una dispersión continua del virus por el continente africano (Bird, Khristova et al. 2007).

Debido al carácter segmentado de su genoma, los virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* pueden intercambiar segmentos completos entre miembros del mismo género o serogrupo. En concreto, para el RVFV se ha demostrado estos intercambios tanto *in vitro* en infecciones de cultivo celular (Saluzzo and Smith 1990), como *in vivo* en infecciones experimentales realizadas con dos cepas virales en mosquitos (Turell, Saluzzo et al. 1990). Los segmentos ARN intercambiados se correspondían a los segmentos M y S, sugiriéndose que este intercambio genético podría proporcionar un mecanismo para incrementar la heterogeneidad del virus, y así influir en la epidemiología y evolución del mismo.

Este hecho se ha confirmado en la naturaleza donde se producen intercambios de los segmentos S, M y L entre diferentes aislados de RVFV en África, llegándose a detectar en un 25% de las cepas analizados (Sall, Zanotto et al. 1999). Dentro de los bunyavirus esta característica es de gran importancia, como se demuestra con el virus Schmallerberg identificado recientemente en Europa, originado mediante el intercambio de segmentos entre diferentes virus del serogrupo Simbu, género *Orthobunyavirus* (Beer, Conraths et al. 2013).

Por último, se ha propuesto que la divergencia del RVFV con respecto a un ancestro común ocurrió en los años 1880/90, asociado a la introducción de un gran número de ovejas y terneros procedentes de Europa durante el período colonial que facilitaron un nuevo nicho para un virus progenitor desconocido. Posteriormente, los ratios de evolución del virus han sido similares a los de otros virus ARN. Por todo ello, la baja diversidad de nucleótidos está relacionada probablemente a la reciente derivación de un ancestro común, más que a la estabilidad del genoma del virus (Grobbelaar, Weyer et al. 2011).

### **1.5 Ciclo de infección viral.**

La infección por el RVFV se lleva a cabo únicamente en el citoplasma celular. La entrada del virus a la célula se realiza mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, pero el tropismo, el receptor y los mecanismos implicados son

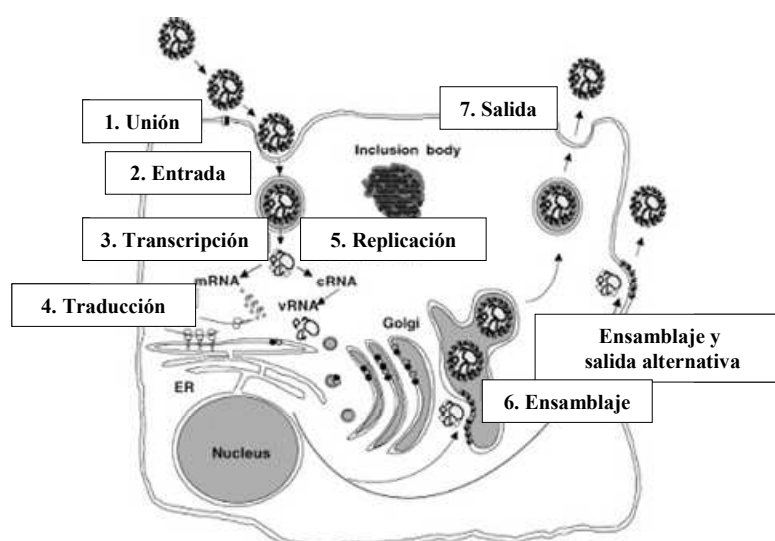
aún poco conocidos. Aunque se ha descrito el papel de la  $\beta 3$  integrina localizada sobre las células endoteliales como receptor para el género *Hantavirus* (Gavrilovskaya, Shepley et al. 1998), y el de la nucleolina como receptor para el CCHFV (Xiao, Feng et al. 2011), ambos receptores no están implicados en la entrada del RVFV a la célula. Recientemente, se ha estudiado el papel del receptor DC-SIGN como posible mecanismo de entrada. Este receptor es una lectina de tipo C, y está localizado en la superficie de las células dendríticas de la dermis, que son las primeras células que entran en contacto con el virus tras una infección natural. Se ha demostrado que DC-SIGN se une al virus e interacciona con los N-glicanos ricos en manosa de las glicoproteínas virales, que permite la introducción del virus en la célula y la infección de la misma (Meier, Helenius et al. 2012).

Por otra parte, se ha analizado el papel del glicosaminoglicano heparan sulfato como receptor, ya que éste se localiza en la superficie de la mayoría de las células eucariotas. Este receptor es ampliamente utilizado por otros virus, y se ha demostrado que su presencia es requerida para la entrada eficiente del RVFV (de Boer, Kortekaas et al. 2012). A pesar de observarse una gran disminución de la infección por RVFV en células deficientes tanto en el receptor DC-SIGN como en glicosaminoglicano heparan sulfato, existe una infección residual que indica la presencia de un factor de unión aún no identificado.

Tras la entrada del virus a la célula, se produce una acidificación en el endosoma que permite la fusión con la membrana viral evitando la degradación del virus en éste (Lozach, Mancini et al. 2010). Diferentes análisis sugieren que la Gc es una proteína de fusión viral de clase II, y está implicada en el proceso de fusión que permite la translocación del genoma viral al citoplasma (Garry and Garry 2004; de Boer, Kortekaas et al. 2012).

A continuación, tiene lugar en el citosol la transcripción de los tres segmentos virales a ARNm, así como la síntesis de ARNcomplementario que sirve de molde para el ARN viral durante la replicación viral, siendo en estos procesos indispensables tanto la nucleoproteína N como la RdRp. Post-transcripcionalmente, la RdRp obtiene secuencias cap del ARNm del hospedador que se añaden al extremo 5' del ARNm viral, no siendo necesaria una cola de poliadenina en su extremo 3'

para su posterior traducción en los ribosomas celulares. Tras el transporte de las glicoproteínas al aparato de Golgi se realiza la glicosilación de las mismas, así como el reclutamiento del genoma y del resto de proteínas estructurales previo a la maduración de las partículas virales mediante *budding* en el lumen del aparato de Golgi (Wasmoen, Kakach et al. 1988; Gerrard and Nichol 2002). Por último, se produce la fusión de las vesículas citoplasmáticas con la membrana plasmática y se libera al exterior celular el virión maduro, como se muestra en la Figura 5.



**Figura 5.** Representación esquemática del ciclo de infección viral del RVFV en la célula. Adaptado de [www.infectionlandscapes.org](http://www.infectionlandscapes.org).

### 1.6 Respuesta inmunológica del hospedador frente a la infección.

El desarrollo de una potente respuesta inmune innata en el hospedador tras la infección es crítica en el control inicial de la diseminación viral. A continuación, se genera una respuesta inmune adquirida que será necesaria para la eliminación del virus, y el posterior establecimiento de una respuesta inmune de memoria duradera (Flick and Bouloy 2005). Tras la infección se detectan Ac de tipo IgM a partir del 4 día post-infección (dpi), mientras la detección de los Ac de tipo IgG se retrasa al 8 dpi con incremento del título hasta el 20 dpi, persistiendo niveles elevados de IgG durante el tiempo. Los Ac pueden ser neutralizantes frente a las glicoproteínas



virales Gn y Gc, y no neutralizantes frente a la nucleoproteína N y la proteína no estructural NSs (Pepin, Bouloy et al. 2010).

El virus ha desarrollado mecanismos de evasión mediante supresión de la respuesta inmune innata del hospedador, que permite la replicación y supervivencia del virus en la célula hospedadora. La proteína viral encargada de ello es la NSs capaz de unirse al ADN celular induciendo defectos en el cromosoma del hospedador (Mansuroglu, Josse et al. 2010) e interrupción del ciclo celular (Baer, Austin et al. 2012).

Los animales infectados desarrollan un rápido incremento de los niveles de Ac no neutralizantes frente a la nucleoproteína N (Flick and Bouloy 2005). Se han llevado a cabo varios estudios con el fin de estudiar su papel en la inducción de una respuesta inmune específica en el huésped. En estos experimentos el rango de protección obtenido en ratones inmunizados con un plásmido que codificaba la N osciló entre el 75% y el 42%, con inducción de Ac específicos y una respuesta linfoproliferativa específica de antígeno (Lagerqvist, Naslund et al. 2009; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010; Boshra, Lorenzo et al. 2011). Similares resultados fueron obtenidos en ovejas inmunizadas con dichos plásmidos (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008). Recientemente se ha descrito la importancia de esta proteína en la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> humanos (Xu, Watts et al. 2013). Todos estos datos sugieren que la protección obtenida con esta proteína esté mediada por mecanismos de respuesta inmune celular dependiente de anticuerpos, como la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), o bien mediante la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Jansen van Vuren, Tiemessen et al. 2011).

Los animales infectados desarrollan Ac neutralizantes frente a las glicoproteínas virales Gn y Gc que son claves en la protección frente a la infección. La presencia de altos niveles de Ac se correlaciona con una buena protección frente a la infección (Pepin, Bouloy et al. 2010). Por una parte, se ha demostrado el papel de éstos en la respuesta inmune al inducir una protección completa tras el desafío mediante ensayos de transferencia pasiva de sueros y anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos frente a Gc y Gn en ratones (Schmaljohn, Parker et al. 1989; Besselaar and Blackburn 1991). Y por otra, se han definido mediante el empleo de

AcMo epítomos neutralizantes y regiones con actividad hemaglutinante en ambas glicoproteínas virales (Keegan and Collett 1986; Besselaar and Blackburn 1991), detectándose epítomos asociados a una potente neutralización independiente del complemento (Dalrymple 1989).

El empleo de vacunas codificando la glicoproteína Gn inducía Ac neutralizantes con capacidad de protección frente al desafío, donde no era necesaria la coexpresión de Gc (Bhardwaj, Heise et al. 2010; Kortekaas, Antonis et al. 2012). Sin embargo, la protección obtenida disminuía al utilizar vacunas expresando únicamente la glicoproteína Gc, indicando la mayor importancia de la Gn en la inducción de Ac neutralizantes con capacidad protectora (Dalrymple 1989). Con respecto a la respuesta celular, se ha descrito recientemente un epítomo MHC de clase I localizado en la Gn en la posición 75-83 (SYAHHRTLL) que estimula la secreción de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c previamente vacunados y desafiados con la cepa atenuada MP12 RVFV (Bhardwaj, Heise et al. 2010).

Por último, solo se ha detectado en un 55% de los animales infectados naturalmente Ac frente a la NSs, indicando que esta proteína no es capaz de inducir una elevada y homogénea respuesta inmune en el hospedador (Fernandez, Billecocq et al. 2012).

### **1.7 Patogénesis y signos clínicos.**

Como ocurre en otros arbovirus, es posible que el RVFV invada los nódulos linfáticos subcutáneos del animal infectado donde se produce una primera replicación viral, y por los vasos linfáticos eferentes alcance la circulación sanguínea donde se dirige hacia los órganos diana: hígado, bazo y cerebro. En el hígado la infección produce cambios hepatocelulares que progresan rápidamente a necrosis hepática masiva, siendo esta la principal lesión microscópica observada en animales domésticos y humanos. Además, se observan alteraciones hemostáticas como hemorragias y petequias originadas por la vasculitis y la necrosis hepática producida por el virus. Por otra parte, en el cerebro infecta neuronas y células gliales que da lugar a encefalitis (Coetzer 1977; Coetzer and Ishak 1982). Los animales infectados presentan leucopenia, elevación de enzimas hepáticas asociados con daño hepático y

trombocitopenia (Gerdes 2004). Se ha descrito la presencia de antígeno viral en las paredes de los pequeños vasos sanguíneos, células adrenocorticales y glomerulares del riñón, así como en la mayoría de células de bazo e hígado (Van der Lugt, Coetzer et al. 1996).

El virus tiene un amplio rango de hospedadores vertebrados donde los más susceptibles a la infección por el RVFV son el ganado ovino, bovino y caprino junto con el hombre (Tabla 2). La mortalidad alcanza el 90%-100% en corderos menores de una semana de edad, y causa abortos en el 90%-100% de las hembras gestantes. Sin embargo, las ovejas adultas son menos susceptibles con una mortalidad entre el 10% y el 30%. Los corderos tienen un período corto de incubación de 12 a 24 h con presencia de fiebre alta, y mueren a las 24-72 h tras la infección.

En el ganado bovino los terneros menores de 1 semana de edad presentan una mortalidad más baja que en ovino, entre el 10% y el 70%, y la mortalidad en adultos también es menor, entre el 5% y el 10%. No obstante, el 90%-100% de las hembras gestantes infectadas abortan.

Los signos clínicos de los animales infectados son: fiebre, letargia, ictericia, descarga nasal, vómitos y diarrea fétida frecuentemente hemorrágica. Las lesiones más frecuentes aparecen en hígado y pulmón, además de hemorragias y linfadenopatías. Estas lesiones se observan también en los fetos junto con placentitis necrótica. Las malformaciones fetales y abortos detectados tras la infección, pueden ser debidos a la alta incidencia de anormalidades en el núcleo y los defectos en el ADN producidos por el virus en la célula hospedadora (Mansuroglu, Josse et al. 2010).

Por último, en el ganado caprino la mortalidad oscila en cabritos entre el 70% y el 100%. La enfermedad es similar a la de ovino, pero hay una mayor resistencia a desarrollarla. Además, los bovinos y ovinos autóctonos son más resistentes a la infección por el RVFV y presentan una menor tasa de abortos con respecto a las razas importadas de origen europeo (Swanepoel 2011).

En rumiantes silvestres la infección es inaparente, pero se ha observado abortos en hembras gestantes tanto en búfalos africanos como en camellos (Gerdes 2004; Flick and Bouloy 2005; Bird, Ksiazek et al. 2009; Ikegami and Makino 2011).

El desarrollo de la enfermedad en el ganado está ligado a la edad y a la respuesta inmune innata del hospedador (do Valle, Billecocq et al. 2010; Swanepoel 2011), modificándose la virulencia de la enfermedad mediante cambios realizados sobre el fenotipo viral (Morrill, Ikegami et al. 2010).

En el hombre, la aparición de síntomas tiene lugar tras un período de incubación de 2-6 días pudiéndose observar fiebre, mialgia, dolor articular y de cabeza, siendo estos síntomas comunes a otras enfermedades (Meegan, Hoogstraal et al. 1979). Normalmente se presenta como una enfermedad leve o inaparente, pero en 1-2% de casos se complica con la aparición de hepatitis, encefalitis, retinitis con pérdida transitoria de la visión, o fiebre hemorrágica donde alcanza en estos casos una mortalidad del 10-20% (Bird, Ksiazek et al. 2009). Durante la última década, se han producido un mayor número de casos y un aumento de la mortalidad de los mismos de hasta el 45%. Esto podría indicar un aumento de la virulencia del RVFV o un incremento de la susceptibilidad en la población, y por tanto una amenaza para la salud pública en los países en riesgo (Adam, Karsany et al. 2010).

**Tabla 2.** Susceptibilidad de los hospedadores vertebrados al RVFV. Adaptada de Gerdes, 2004.

<b>Muy susceptibles (&gt;70% †)</b>	<b>Susceptibles (10-70% †)</b>	<b>Moderadamente susceptibles</b>	<b>Susceptibles (infección inaparente)</b>	<b>Resistentes</b>
Corderos	Terneros	Vacas	Camellos	Pájaros
Cabritos	Ovejas	Cabras	Caballos	Reptiles
Cachorros		Búfalos	Cerdos	Anfibios
Gatitos		Humanos	Perros	
Ratones			Gatos	
Hámsteres			Cobayas	
			Conejos	

### 1.8 Diagnóstico y prevención de la enfermedad.

Los ensayos de diagnóstico del RVFV están basados en la detección del antígeno viral, o de anticuerpos específicos.

➤ **Identificación del agente:** se puede realizar a partir de muestras de sangre, o de tejidos de hígado, bazo y cerebro o fetos. La detección en sangre solo se puede realizar durante la primera semana tras la infección, ya que después desciende la viremia. El antígeno viral puede detectarse mediante inmunodifusión, fijación del complemento a partir de suspensiones de tejidos, e inmunofluorescencia directa en frotis de hígado, bazo y cerebro. Mientras, el ácido nucleico viral puede detectarse mediante RT-PCR de sangre o tejidos. Además, se puede realizar ensayos de aislamiento viral sobre cultivos de células Vero y BHK-21, cultivos primarios de origen ovino o bovino, así como inoculación por vía intracraneal o intraperitoneal en ratones lactantes o destetados, y en hámsteres.

➤ **Pruebas serológicas:** Los métodos empleados son los siguientes: ensayo de neutralización viral (VNT), ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI) e inhibición de la hemaglutinación (HI) (Swanepoel, Struthers et al. 1986).

Aunque el ensayo de neutralización es muy sensible y específico detectándose Ac neutralizantes a partir del 3 dpi, implica el manejo de virus no pudiéndose emplear en zonas no endémicas y requiere su manipulación en laboratorios de alta contención.

Se han desarrollado ensayos de ELISA para la detección de Ac específicos anti-RVFV de tipo IgG, IgM y anticuerpos totales en sueros procedentes de especies susceptibles ya sea empleando como antígeno virus inactivado o proteínas recombinantes como la nucleoproteína N (Jansen van Vuren, Potgieter et al. 2007; Jansen van Vuren and Paweska 2009) y la glicoproteína Gn (Jackel, Eiden et al. 2013). Los ELISAs basados en virus presentan inconvenientes como la producción e inactivación del virus, así como la prohibición de su empleo en zonas no endémicas (Paweska, Burt et al. 2003; Paweska, Burt et al. 2005; Paweska, Mortimer et al. 2005), mientras los ELISAs basados en proteínas recombinantes proporcionan ventajas con respecto a la seguridad, estabilidad y relación coste-efectividad, además de poder emplearse en regiones no endémicas.

Por último, se ha descrito un ensayo Luminex de suspensión de microesferas magnéticas múltiples que permite al mismo tiempo la detección de Ac frente a la nucleoproteína N y la glicoproteína Gn (van der Wal, Achterberg et al. 2012).

La prevención ante un brote de la RVF es de gran importancia, debido a la ausencia de un tratamiento específico frente a la enfermedad en humana y veterinaria. El efecto del antiviral ribavirina es limitado, debido a su baja capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, no siendo recomendado en infecciones no complicadas (Peters, Reynolds et al. 1986). Recientemente, se ha utilizado el antiviral favipiravir (T-705) en el tratamiento de ratas y hámsteres infectados experimentalmente con niveles de protección más elevados con respecto a la ribavirina. Cuando ambos fármacos fueron administrados, la protección se incrementó de forma significativa (Caroline, Powell et al. 2014; Scharton, Bailey et al. 2014). También, se han realizado ensayos con IFN- $\alpha$  (Morrill, Jennings et al. 1989) e IFN- $\gamma$  en macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) infectados (Morrill, Czarniecki et al. 1991), donde se ha observado tanto reducción de la viremia como disminución de la patogenicidad.

Los métodos de prevención están basados en diferentes estrategias, como el empleo de insecticidas para el control de vectores artrópodos, siendo esta medida difícil y poco efectiva cuando existe una gran cantidad de mosquitos. Además, se puede llevar a cabo el control de la migración de los animales y sus productos en zonas fronterizas desde países infectados aunque esta medida carece de eficacia ya que no es posible realizar un control sobre los animales silvestres.

Por último, se han realizado predicciones sobre la aparición de brotes de la enfermedad basadas en medidas obtenidas por satélite como la temperatura de la superficie oceánica (SST) y el Índice de Vegetación Diferenciada Normalizada (NDVI). Los brotes de RVF están asociados al fenómeno climático El Niño que se produce de forma cíclica cada 3-8 años. Este fenómeno ocurre cuando aumenta la temperatura del agua en la superficie del Océano Pacífico de Sudamérica, y disminuye la temperatura en las costas de Australia e Indonesia. A su vez se produce el mismo proceso en el Océano Índico, dando lugar a un aumento de la temperatura

oceánica en la costa africana. A consecuencia de ello, se producen alteraciones en las corrientes de aire que originan fuertes lluvias en la región oriental de África que generan un aumento de la vegetación registrado mediante el Índice de Vegetación Diferenciada Normalizada (NDVI). Así se han estimado brotes de la RVF en Kenia con una antelación de hasta 5 meses con una seguridad del 95-100% (Linthicum, Anyamba et al. 1999; Anyamba, Chretien et al. 2009). La principal ventaja de este método es su relativo bajo coste, y su uso permite tomar medidas preventivas basadas en la vacunación del ganado susceptible y el control de mosquitos (Linthicum, Bailey et al. 1990). Sin embargo, la aplicación de estos modelos es limitada debido a que los procesos ecológicos y epidemiológicos implicados son diferentes en otras áreas de África (Martin, De Simone et al. 2007).

## **2 Modelos animales de la infección.**

A continuación, se describen las principales características de los diferentes modelos animales empleados para los ensayos de infección con el RVFV.

El modelo murino es uno de los más susceptibles a la infección. En ellos se produce altos títulos de viremia en sangre, con alteraciones sanguíneas y lesiones histopatológicas que mimetizan la patología encontrada en corderos neonatales y humanos (Mims 1956; Smith, Steele et al. 2010). Como desventaja encontramos la ausencia de fiebre hemorrágica y de enfermedad ocular tras la infección (Smith, Steele et al. 2010; Ikegami and Makino 2011).

Los ratones inoculados por vía intraperitoneal o subcutánea mueren entre 3-6 dpi observándose los siguientes signos clínicos: pelo erizado, postura encorvada, secreción ocular, letargia y disminución de la actividad, donde la necropsia revela una hepatitis severa. En algunos casos, se produce neuroinvasión observándose a los 8-9 dpi parálisis de las extremidades posteriores, movimientos no coordinados y muerte de los animales por encefalitis (Smith, Steele et al. 2010). La inoculación mediante aerosoles no modifica el desarrollo de hepatitis en el animal, pero la aparición de neuropatologías es más temprana que por vía parenteral reproduciéndose la patología observada en el hombre (Reed, Lin et al. 2013).

La cepa de ratón más empleada es BALB/c (Smith, Steele et al. 2010), y en menor medida C57/BL6 (Dodd, Bird et al. 2012), CB6F<sub>1</sub> (Papin, Verardi et al. 2011) y MBT/Pas (Ayari-Fakhfakh, do Valle et al. 2012), donde generalmente se utilizan aislados virulentos del RVFV en la infección experimental. Recientemente se ha descrito la importancia de la saliva de mosquitos durante la infección, donde estos componentes producen una mayor mortalidad, replicación viral y patogenicidad en el animal, considerándose de gran importancia en el desarrollo de la enfermedad (Le Coupanec, Babin et al. 2013).

También se han realizado ensayos de infección letal con cepas atenuadas del RVFV como la cepa mutagenizada MP12 y el clon 13 (aislado natural) en ratones deficientes para la subunidad  $\beta$  del receptor IFN $\alpha/\beta$  denominados IFNAR<sup>-/-</sup>. La susceptibilidad a la infección y el desarrollo de la misma se deben a la ausencia de respuesta inmune innata mediada por el IFN de tipo I (Bouloy, Janzen et al. 2001; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010; Boshra, Lorenzo et al. 2011).

Desde los años 1930 se ha demostrado la susceptibilidad de la rata a la infección, donde los resultados obtenidos tras la infección experimental difieren entre las diferentes cepas. Así, las cepas Wistar-Furth y Brown Norway son altamente susceptibles y mueren a los 3-5 dpi, con presencia de necrosis hepática y lesiones necróticas en diferentes órganos, mientras las cepas ACI y MAXX muestran una mortalidad del 50% retrasada hasta los 7-14 dpi, observándose signos clínicos neurológicos con detección microscópica de encefalitis. Por último, la cepa Lewis no presenta signos de enfermedad tras la infección, pero no son refractarias a la misma debido a que se detecta viremia en sangre (Peters and Slone 1982; Anderson, Slone et al. 1987). Esta variabilidad está relacionada con el fondo genético del animal donde se sugiere que la resistencia a la infección es codificada por un gen dominante Mendeliano (Anderson, Rosebrock et al. 1991), detectándose incluso diferencias dentro de una misma cepa al existir variabilidad entre diversos criadores (Ritter, Bouloy et al. 2000).



El hámster Sirio es altamente susceptible a la enfermedad, siendo el más empleado en experimentos de transmisión del RVFV por mosquitos (Turell, Wilson et al. 2010; Iranpour, Turell et al. 2011). Tras la infección se produce necrosis hepática similar a la del ratón y muerte de los animales a 2-3 dpi. La transferencia de Ac neutralizantes protege frente al daño hepático, pero más tarde desarrollan encefalitis muriendo a día 11 pi (Niklasson, Meadors et al. 1984).

La infección por el RVFV en gerbos produce una encefalitis letal con mínimo daño hepático muriendo entre 1-3 semanas post-infección, donde los animales más jóvenes son los más afectados. Debido a la patología desarrollada, se utiliza como modelo animal para estudios de neuroinvasividad (Anderson, Slone et al. 1988).

El ovino es empleado con el fin de estudiar la eficacia de las vacunas diseñadas frente a la RVF así como la patogenia producida por el virus en el hospedador natural. Las ovejas son muy susceptibles a la infección pero muestran diferentes signos clínicos y mortalidad según la cepa viral, raza y edad del animal empleados. Además, existen variaciones dentro de la misma raza de oveja que indica una implicación del fondo genético del hospedador en la resistencia a la enfermedad (Coetzer and Ishak 1982; Swanepoel, Struthers et al. 1986; Olaleye, Tomori et al. 1996; Busquets, Xavier et al. 2010).

La infección con el RVFV ha sido estudiada en corderos neonatos, ovejas adultas y gestantes empleándose tanto razas autóctonas procedentes de África como razas europeas (Ripollesa, Merino). Estos estudios han utilizado cepas virulentas y atenuadas, que fueron inoculadas por vía subcutánea generalmente, empleándose también la vía intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. La infección experimental con el RVFV en corderos neonatos produce una enfermedad aguda y mortal (Easterday, Mc et al. 1962; Easterday 1965; Coetzer 1977; Van der Lugt, Coetzer et al. 1996), mientras las ovejas mayores de una semana de edad son relativamente resistentes (Easterday, Mc et al. 1962; Tomori 1979; Swanepoel, Struthers et al. 1986; Busquets, Xavier et al. 2010). Además, el desarrollo de

lesiones oculares tras la infección viral permite su empleo como modelo de estudio de la patología ocular en el hombre (Galindo-Cardiel, Busquets et al. 2012).

Por otra parte, se han empleado ovejas gestantes con el fin de estudiar la virulencia residual de diferentes vacunas atenuadas. A pesar de su seguridad en adultos, se han detectado abortos y malformaciones fetales en ovejas gestantes con las cepas atenuadas Smithburn (Coetzer and Barnard 1977) y MP12 (Hunter, Erasmus et al. 2002), obteniéndose una alta seguridad de la vacunación con el “clon 13” en ovejas en diferentes estadios de gestación (Dungu, Louw et al. 2010).

Se han llevado a cabo diferentes estudios experimentales en bovino con el fin de estudiar la patogénesis del virus y la seguridad de las diferentes cepas atenuadas. Tras la infección con cepas virulentas se han observado diversos signos clínicos siendo éstos más graves en los animales más jóvenes (Coackley, Pini et al. 1967; Rippy, Topper et al. 1992; von Teichman, Engelbrecht et al. 2011). Por otra parte, no se han detectado signos de infección durante la evaluación de las cepas atenuadas Smithburn y “clon 13” en terneros (von Teichman, Engelbrecht et al. 2011), ni con la cepa atenuada MP12 en vacas gestantes y terneros neonatos (Morrill, Mebus et al. 1997; Morrill, Mebus et al. 1997).

Durante la primera infección experimental en cabritos de dos meses fue detectada fiebre junto a diversos signos clínicos según la ruta de inoculación empleada, y muerte de todos los animales (Iman, el-Karamany et al. 1978). Posteriormente, se ha analizado la patogenicidad de la cepa atenuada Smithburn en cabritos, cabras adultas y gestantes observándose daño hepático en todos los animales vacunados y abortos (Kamal 2009). Por último, se ha estudiado la respuesta inmune innata y adquirida tras la infección producida por la cepa virulenta RVFV ZH501 propagada tanto en células de mamífero como en células de insecto, obteniéndose viremia y fiebre más aguda en aquellos animales infectados con la cepa generada en células de insecto (Nfon, Marszal et al. 2012).

Los primates no humanos son empleados para los ensayos de vacunas y tratamientos antivirales previos a los ensayos clínicos en humanos. Como inconveniente a este modelo animal se observa ausencia de mortalidad en todos los animales tras la infección, y variación de la susceptibilidad según la cepa viral, ruta de inoculación y especie empleada (Ross, Bhardwaj et al. 2012). La especie más utilizada es el macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) donde la enfermedad desarrollada tras la inoculación con la cepa virulenta ZH501 por vía intravenosa es similar a la humana, y varía desde enfermedad severa en el 20% de los animales hasta infección subclínica e inaparente en la mayoría de los casos (Peters, Jones et al. 1988).

Otras especies como los babuinos (*Papio anubis*) muestran viremia sin signos clínicos tras la infección viral (Davies, Clausen et al. 1972), mientras se ha descrito una mayor susceptibilidad a la infección vía subcutánea en los monos titís (*Callithrix jacchus*) en comparación con los macacos (Smith, Bird et al. 2012). Asimismo, la infección mediante aerosoles ha producido en los monos titís y en el mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) fiebre y signos de encefalitis similar a la infección en humano. Debido a la alta susceptibilidad de estas dos especies a través de una vía similar a la infección natural, se sugiere la utilización de este modelo animal para el desarrollo de vacunas y terapias frente al RVFV (Hartman, Powell et al. 2013).

### **3 Vacunas frente a la RVF.**

La vacunación es la única estrategia efectiva en el control de la enfermedad empleándose vacunas basadas en virus inactivado con formalina y vacunas atenuadas en países endémicos. Actualmente no existen vacunas aprobadas para su empleo en el ganado en países libres de la enfermedad, ni vacunas licenciadas para su uso en humanos.

Una vacuna efectiva frente al RVFV tiene que ser segura en el hospedador. A su vez, debe inducir una respuesta inmune rápida y duradera con capacidad protectora tras una única dosis que permita diferenciar animales vacunados de los infectados (DIVA). Además, esta vacuna tiene que ser estable a temperatura ambiente, y con costes de producción bajos, para que la vacunación del ganado sea viable. Por

último, sería deseable que la vacuna(s) desarrollada(s) pudiera, tras las modificaciones de seguridad pertinentes, ser de aplicación en la población humana de riesgo con el fin de obtener una protección completa frente a la enfermedad.

### **3.1 Vacunas inactivadas y atenuadas.**

Las primeras vacunas generadas frente a la enfermedad estaban basadas en virus atenuado o inactivado. La ventaja de las vacunas inactivadas es que son más seguras pero menos inmunogénicas, y en el caso de las atenuadas se induce una elevada inmunogenicidad tras una única dosis pero presentan efectos adversos como abortos y teratogénesis.

El principal inconveniente de las vacunas atenuadas es su posible reversión a la virulencia, estando por ello prohibido su empleo en países no endémicos.

#### **➤ Cepa Smithburn.**

Fue aislada de mosquitos procedentes de Uganda en 1944, y se trata de una cepa neurotrópica obtenida tras 82 pases en cerebro de ratón lactante, donde adquirió neurotropismo y perdió hepatotropismo (Smithburn 1949). Desde 1950 se ha utilizado como vacuna en África durante el control de los brotes de la enfermedad en el ganado. Esta vacuna es altamente inmunogénica y eficaz en ovejas y vacas no gestantes, pero causa hasta un 25% de abortos o efectos teratogénicos en hembras gestantes (Coetzer and Barnard 1977; Botros, Omar et al. 2006; Kamal 2009).

#### **➤ Vacuna inactivada con formalina.**

Se trata de una vacuna derivada de la cepa Smithburn y está disponible para uso veterinario donde es segura en animales gestantes. Es poco inmunogénica siendo necesario dar varias revacunaciones periódicas para mantener una inmunidad efectiva (Barnard and Botha 1977; Barnard 1979).

Actualmente, la única vacuna disponible para uso humano es la vacuna inactivada con formalina TSI-GSD-200 (Pittman, Liu et al. 1999). Ésta induce Ac neutralizantes, pero presenta inconvenientes como el requerimiento de tres dosis iniciales y una revacunación anual para el mantenimiento de la inmunogenicidad.

Además, los elevados costes de producción y su limitada producción hacen difícil su distribución a la población en general (Kark, Aynor et al. 1982; Kark, Aynor et al. 1985; Frank-Peterside 2000).

#### ➤ **MP12.**

Generada por pases sucesivos de la cepa ZH548 RVFV en cultivo celular de MRC-5 (células diploides de fibroblastos de pulmón fetal humano) en presencia del mutágeno químico 5-fluorouracilo (Caplen, Peters et al. 1985). Esta cepa es sensible a la temperatura (Saluzzo and Smith 1990), y presenta mutaciones puntuales en los tres segmentos genómicos que dan lugar a la atenuación del virus (Vialat, Muller et al. 1997). Tras una única dosis en ovino y bovino induce Ac neutralizantes capaces de proteger tras el desafío (Morrill, Carpenter et al. 1991; Morrill, Mebus et al. 1997). En corderos no es letal y genera una respuesta inmune protectora, donde además los animales son capaces de adquirir Ac a través del calostro de madres inmunizadas (Morrill, Jennings et al. 1987; Hubbard, Baskerville et al. 1991). A su vez, se ha demostrado que el virus no se elimina por leche tras la vacunación y no induce abortos en vacas gestantes (Morrill, Mebus et al. 1997). Sin embargo, la vacunación en ovejas produce abortos y teratogénesis a tiempos tempranos de gestación (Hunter, Erasmus et al. 2002).

En el hombre, la vacuna MP12 ha demostrado ser segura e inmunogénica, y actualmente ha finalizado la Fase Clínica II como se detalla en la página web <http://clinicaltrials.gov/> (Bouloy and Flick 2009; Ikegami and Makino 2009).

#### ➤ **Clon 13.**

Fue aislado a partir de una placa de la cepa 74HB59 RVFV procedente de un caso humano no mortal de la República Central Africana, y su uso como vacuna está aprobado actualmente en Sudáfrica. Presenta una delección del 70% de la ORF de la proteína NSs, siendo significativamente atenuada (Muller, Saluzzo et al. 1995). La ausencia de la NSs, principal factor de virulencia y antagonista del IFN de tipo I (Le May, Dubaele et al. 2004), permite que los animales vacunados desarrollen una respuesta inmune completa. Ovejas inmunizadas con el clon 13 han demostrado una

alta seguridad de la vacuna sin detección de signos clínicos, ni abortos ni teratogénesis en hembras gestantes, con inducción de Ac neutralizantes capaces de proteger frente al desafío viral (Dungu, Louw et al. 2010), obteniéndose resultados similares en terneros (von Teichman, Engelbrecht et al. 2011). Sin embargo, se ha demostrado la presencia de virus en la saliva de los mosquitos infectados experimentalmente, lo que no excluye la posibilidad de que se produzca un intercambio natural de segmentos genómicos virales con otras cepas revirtiendo así a la virulencia (Moutailler, Krida et al. 2010; Amraoui, Krida et al. 2012). Recientemente, se ha realizado un experimento en ovejas con la cepa R566 que contiene el segmento S del clon 13 y los segmentos M y L de MP12, obteniéndose una elevada protección tras el desafío (Kortekaas, Oreshkova et al. 2014).

### **3.2 Vacunas de nueva generación.**

Mediante el uso de nuevas tecnologías se han desarrollado vacunas basadas en proteínas recombinantes, partículas similares a virus (VLPs), vectores virales y ADN. El diseño de estas vacunas se ha centrado en las glicoproteínas Gn y Gc, y en la nucleoproteína N.

A continuación, se describen las vacunas de nueva generación generadas frente a RVF y los resultados obtenidos con cada una de ellas.

#### **► Proteínas recombinantes.**

Consiste en la producción de proteínas virales en diferentes sistemas de expresión como bacterias, levaduras y baculovirus. La vacunación con proteínas recombinantes es segura, pero requiere de elevadas dosis de proteína y el empleo de adyuvantes para lograr una inmunidad protectora. Además, la purificación de la proteína es laboriosa y en algunos casos de elevado coste, lo que dificulta su producción a gran escala. Cabe destacar que los sistemas celulares procariotas glicosilan de una forma diferente y por tanto, la proteína expresada tiene una conformación distinta a la nativa al no presentar los mismos epítomos y estructura, generándose tras la inmunización una respuesta inmune diferente a la obtenida en una infección natural.

Las glicoproteínas Gn y Gc expresadas en bacterias fueron poco inmunogénicas obteniéndose una protección parcial tras el desafío en ratones (Collett 1987), mientras las obtenidas con baculovirus recombinante en células de insecto Sf9 inducían Ac neutralizantes permitiendo una protección completa (Schmaljohn, Parker et al. 1989) con resultados similares en ratones y ovejas inmunizados con el ectodominio de la Gn generado en células de insecto *Drosophila Schneider* (S2) (de Boer, Kortekaas et al. 2010; Kortekaas, Antonis et al. 2012).

Por otra parte, ratones BALB/c inmunizados con dos dosis de la nucleoproteína N expresada en bacterias lograban una protección parcial del 60% (Wallace, Ellis et al. 2006). Mientras que en otro experimento, esta proteína obtenida en el vector de expresión de bacterias pET32(a)+ inducía una inmunidad esterilizante en ratones con incremento del IFN tipo I y la eliminación del virus tras el desafío (Jansen van Vuren, Tiemessen et al. 2011), no alcanzándose esta protección en ovino (Jansen van Vuren 2010).

#### ► *Virus-Like Particles (VLPs).*

Se han producido VLPs del RVFV tanto en sistemas de expresión de proteínas en la línea celular de insecto *Drosophila Schneider* S2, como en las líneas celulares de mamífero 293T y HEK-293 (células embrionarias de riñón humano). Para su obtención, se ha requerido de la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc, junto con la nucleoproteína N del RVFV. La protección conferida en ratones con tres dosis de  $10^6$  VLPs fue del 92% tras el desafío viral (Naslund, Lagerqvist et al. 2009), mientras en otro experimento la protección disminuyó al 60% con tres dosis de  $6 \mu\text{g}$  de VLPs más adyuvante (Mandell, Koukuntla et al. 2010). Esta protección fue completa con una dosis de  $10^6$  VLPs al incluirse el gen codificante de la nucleoproteína N (Pichlmair, Habjan et al. 2010).

Por otra parte, se han generado VLPs con ambas glicoproteínas virales exclusivamente, que permiten diferenciar animales vacunados de infectados. El empleo de dos dosis de  $10 \mu\text{g}$  de VLPs en ratones indujo tras el desafío una protección completa mediada por Ac neutralizantes (de Boer, Kortekaas et al. 2010), mejorando los resultados obtenidos en un experimento anterior donde fue

demostrada la presencia de una respuesta inmune duradera tanto humoral, con detección de Ac neutralizantes, como celular, de tipo  $T_{helper}$  (Th)1 y Th2 (Mandell, Koukuntla et al. 2010).

### ➤ Vectores virales recombinantes.

Actualmente se emplean como vectores recombinantes virus ADN como *Poxvirus*, *Adenovirus* y *Herpesvirus*, y virus ARN como *Paramyxovirus*, *Alphavirus*, *Bunyavirus* y *Rhabdovirus*, entre otros (Brun, Albina et al. 2008).

Tras su inoculación, el virus recombinante expresa la proteína exógena insertada e induce una respuesta inmune específica similar a la inducida por el patógeno. Por lo general, los virus empleados como vectores vacunales no replican o lo hacen ineficientemente en el hospedador natural, eliminando los riesgos relacionados como la posible reversión a la virulencia (Boshra, Lorenzo et al. 2011). Como inconveniente, la presencia de Ac frente al vector puede disminuir la efectividad de su administración repetida como vacuna, seleccionándose para ello virus que no sean capaces de infectar al hospedador al que va dirigida la vacuna.

En la actualidad, se han descrito una gran variedad de vacunas experimentales basadas en diferentes vectores virales expresando las proteínas del RVFV como replicones de *Alphavirus*, replicones de *Adenovirus*, *Poxvirus* y *Paramixovirus*.

Se han empleado replicones de *Alphavirus* (familia *Togaviridae*) frente a la RVF como Sindbis virus (SINV) y Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV). En el modelo murino una dosis de VEEVrep codificando la glicoproteína Gn indujo niveles moderados de Ac neutralizantes con protección completa tras el desafío, no obteniéndose el mismo resultado con el replicón SINV (Gorchakov, Volkova et al. 2007). Posteriormente ratones inmunizados con el replicón SINV codificando ambas glicoproteínas Gn y Gc junto a la NSm protegieron mediante inducción de una respuesta inmune humoral, detectándose en ovejas niveles moderados de Ac neutralizantes (Heise, Whitmore et al. 2009). A su vez, se ha utilizado el replicón VEEVrep/Gn como dosis de recuerdo tras la inmunización con dos dosis de ADN



codificando el ectodominio de la Gn (Gn-C3d), incrementando la respuesta de tipo Th1 y Th2 en ratones (Bhardwaj, Heise et al. 2010).

Los replicones de *Adenovirus* son ampliamente utilizados como vacuna y terapia génica, y son capaces de insertar en su genoma secuencias genéticas exógenas de gran tamaño. Tras una única dosis en ratones del adenovirus recombinante no replicativo CAdVax codificando las glicoproteínas Gn y Gc se observó una protección completa tras el desafío debido a una potente y duradera respuesta inmune humoral mediada por Ac neutralizantes, donde la existencia previa de Ac frente al vector disminuyó la eficacia de la vacuna (Holman, Penn-Nicholson et al. 2009). Recientemente, se ha descrito un adenovirus no replicativo derivado de chimpancé (ChAdOx1) como vector de expresión de las glicoproteínas Gn y Gc. La protección total observada en ratones se correspondió con una fuerte respuesta inmune mediada por Ac neutralizantes y linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Debido a la ausencia de Ac frente a este vector en el hombre esta vacuna es considerada un candidato potencial para ensayos clínicos (Warimwe, Lorenzo et al. 2013).

Los vectores virales basados en *Poxvirus* presentan una elevada seguridad debido a su alta atenuación, y pueden utilizarse como vacunas multivalentes al permitir la inserción en su genoma de uno o más genes exógenos. En 1987 la cepa Western Reserve (WR) del virus Vaccinia (VV) (género *Orthopoxvirus*) se empleó para la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc, obteniéndose la atenuación del vector vacunal mediante la inserción del gen codificante de ambas proteínas en el locus de la timidina kinasa (TK). Se inmunizaron ratones con una dosis vacunal, con inducción de Ac neutralizantes y protección completa tras el desafío (Collett 1987). Por otro lado, se ha utilizado la cepa atenuada KS1 del virus de la dermatosis nodular contagiosa (LSDV) (género *Capripoxvirus*) para la expresión de ambas glicoproteínas. En un primer experimento, se observó con dos dosis de r-LSDV-GnGc inducción de Ac neutralizantes y protección tras el desafío en ratones, con ausencia de fiebre y lesiones en ovejas inmunizadas (Wallace, Ellis et al. 2006), confirmandose ambos resultados posteriormente (Soi, Rurangirwa et al. 2010).

Asimismo, estudios realizados con la vacuna rCpoxNSmGn en ratones sugieren que esta vacuna protege mediante inducción de Ac neutralizantes y linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (Ayari-Fakhfakh, do Valle et al. 2012).

Recientemente, la cepa Copenhagen del virus Vaccinia se ha utilizado como vector vacunal de las glicoproteínas del RVFV, observándose con dos dosis de vCOGnGc en ratones una protección del 90%, que disminuía al 50% con una dosis, estando dicha protección mediada por Ac neutralizantes. A pesar de ser una vacuna segura se han observado, en ratones inmunodeprimidos C.B-17 SCID, lesiones en la piel atribuibles a una virulencia residual de este vector. Esta vacuna fue empleada en primates no humanos donde tras la administración de dos dosis inducía elevados títulos de Ac neutralizantes, junto a la presencia de pequeñas lesiones en la piel (Papin, Verardi et al. 2011).

Por último, se ha utilizado como vector vacunal el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), género *Avulavirus* familia *Paramyxoviridae*. La ausencia de anticuerpos frente a NDV (un virus de aves) en el ganado es una gran ventaja ya que evita el problema de la inmunidad previa frente al vector. La vacunación realizada en ratones y ovejas con la cepa lentogénica no virulenta LaSota codificando ambas glicoproteínas (NDFL-GnGc) indujo Ac neutralizantes, así como protección frente al desafío (Kortekaas, de Boer et al. 2010; Kortekaas, Antonis et al. 2012). A su vez, el empleo de dos dosis de la vacuna NDFL codificando la glicoproteína Gn por vía intramuscular en terneros inducía Ac neutralizantes, con niveles que podrían proteger ante el desafío viral (Kortekaas, Dekker et al. 2010). Este vector es considerado una vacuna candidata frente a RVF al no detectarse viremia ni efectos adversos tras la vacunación en diferentes especies de mamíferos.

### ➤ Clon infeccioso del RVFV.

La posibilidad de rescatar virus infeccioso a partir de la transfección celular de plásmidos conteniendo los tres segmentos genómicos del RVFV bajo el control de distintos promotores virales y/o celulares ha permitido la manipulación del genoma y la generación de variantes atenuadas, principalmente mediante la delección

del factor de virulencia NSs. Las partículas virales generadas mediante genética reversa son virtualmente idénticas al RVFV, y dependiendo de la estrategia utilizada pueden ser defectivas o no en replicación, mediante la aportación en trans de algunos de sus componentes (Dodd, Bird et al. 2012; Kortekaas, Oreshkova et al. 2014). En cualquier caso los virus rescatados son capaces de infectar células de mamífero y de insecto, donde expresan las proteínas virales, induciendo una eficiente respuesta inmunológica. Por ello, son vacunas seguras y pueden manipularse sin la necesidad de altas medidas de biocontención. El empleo de una dosis en ratones y ovejas fue capaz de inducir Ac neutralizantes y proteger tras el desafío viral (Kortekaas, Oreshkova et al. 2011; Kortekaas, Antonis et al. 2012) donde la protección a tiempos tempranos estaba relacionado con el estado antiviral producido por la infección y replicación de la vacuna, mientras que a tiempos tardíos fue asociado a una respuesta inmune adquirida específica (Dodd, Bird et al. 2012). Estas vacunas pueden emplearse en el hombre y en el ganado debido a la baja patogenicidad que presentan y a la fuerte respuesta inmune inducida tras una dosis, pero aún debe mejorarse la producción y manufacturación de la misma para una potencial aplicación a gran escala.

#### **4 Vacunas ADN.**

Se han empleado en el desarrollo de vacunas frente a enfermedades causadas por virus, parásitos y bacterias, y para el tratamiento de cáncer, enfermedades autoinmunes y alergias (Robinson and Torres 1997; Donnelly, Wahren et al. 2005), existiendo actualmente dos vacunas comerciales, una frente al virus del Nilo Occidental (WNV) para équidos (Davis, Chang et al. 2001) y otra frente al virus de la necrosis hematopoyética para salmones (Garver, LaPatra et al. 2005).

Se basan en el empleo de plásmidos de origen bacteriano en los que se insertan los genes que codifican la proteína de interés bajo el control de un promotor, frecuentemente el del citomegalovirus humano (CMV), que permite la transcripción en las células eucariotas. Una vez se ha inoculado la vacuna ADN, la célula transfectada incorpora al núcleo el plásmido recombinante y se produce la expresión de la proteína de interés.

Se consideran buenas candidatas como vacunas ya que son capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular, incluso en neonatos, sin causar riesgo en el animal inmunizado (Hassett, Zhang et al. 2000). Presenta una serie de ventajas como la expresión endógena del antígeno similar a la infección natural, el mantenimiento de los epítomos y la estructura antigénica del patógeno del que proceden, y la inducción de una inmunidad duradera al persistir durante tiempo la estimulación antigénica. Por otra parte, la síntesis de diferentes vacunas es factible mediante sencillas modificaciones realizadas en la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de interés. Asimismo, se pueden emplear en países en desarrollo ya que son altamente estables y no necesitan mantener la “cadena de frío” para su viabilidad, junto a su producción fácil y barata (Huygen 2005; Kutzler and Weiner 2008). Por último, la probabilidad de incorporación del ADN al material genético del hospedador es baja ya que su producción es realizada en *E. coli* (Wang, Troilo et al. 2004).

La inmunización puede realizarse mediante diferentes métodos como el ADN desnudo en solución salina, y partículas de oro recubiertas de ADN denominado *gene gun* donde son requeridas cantidades menores de ADN para la vacunación. A su vez, la ruta de inoculación seleccionada puede favorecer la inducción de una respuesta inmune de tipo Th1 o Th2 frente a la proteína que codifican (Feltquate, Heaney et al. 1997).

El empleo de vacunas ADN codificando las glicoproteínas Gn y Gc del RVFV mediante *gene gun* confería protección completa tras el desafío en ratones BALB/c mediada por Ac neutralizantes (Spik, Shurtleff et al. 2006; Lagerqvist, Naslund et al. 2009). Esta protección disminuyó al 20% en ausencia de Ac neutralizantes mediante su empleo como ADN desnudo (Wallace, Ellis et al. 2006), correspondiéndose estas diferencias al método de inmunización empleado y no a la cantidad de ADN inoculado. Por otra parte, si esta vacuna codificaba la nucleoproteína N a través de la estrategia *gene gun* inducía una protección parcial con altos niveles de Ac no neutralizantes y una fuerte respuesta de proliferación celular, desconociéndose por el momento los mecanismos implicados en la protección (Lagerqvist, Naslund et al. 2009).

Se han detectado niveles elevados de Ac neutralizantes en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> inmunizados con ADN desnudo expresando ambas glicoproteínas (pCMV-M4) con capacidad de protección completa tras el desafío, mientras que con la nucleoproteína N (pCMV-N) confería una protección parcial tras el desafío y altos títulos de Ac no neutralizantes. A su vez, la inmunización con ambas vacunas desarrolló una respuesta celular linfoproliferativa específica implicada en la protección parcial observada (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010; Boshra, Lorenzo et al. 2011).

La inmunización con pCMV-N en ovejas induce una respuesta humoral potente y duradera, detectándose una respuesta celular tras el recuerdo con la vacuna atenuada MP12 en aquellos animales inmunizados con una combinación de plásmidos codificantes del segmento M completo y la nucleoproteína N. Por ello, dichas estrategias podrían ser utilizadas en un futuro en el estudio de la respuesta celular implicada en la eliminación de la infección en ovejas (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008).

Aunque las vacunas basadas en ADN han funcionado frente a infecciones virales en el modelo murino, éstas no han sido tan eficaces en otras especies animales ni en el hombre. Con el fin de potenciar la respuesta inmune de estas vacunas, se han empleado diferentes estrategias como la co-administración de genes que codifican citoquinas, quimioquinas y moléculas coestimuladoras como IL-4, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , CD80 y CD86 (Reyes-Sandoval and Ertl 2001), nuevas técnicas de inmunización como la electroporación (Coban, Kobiyama et al. 2011), y moléculas que permiten el direccionamiento de antígenos a sitios de degradación celular específicos (Rodriguez and Whitton 2000). Así, el plásmido codificante de la nucleoproteína N fusionada a ubiquitina incrementó tanto el título de Ac como la respuesta específica de linfocitos T, dando lugar a un aumento en la protección tras el desafío viral en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> (Boshra, Lorenzo et al. 2011), mientras que un plásmido expresando la glicoproteína Gn fusionado a un trímero de C3d, un fragmento de la proteína del complemento C3, incrementó el nivel de Ac neutralizantes y la protección en ratones BALB/c (Bhardwaj, Heise et al. 2010).

Otra de las estrategias más utilizadas ha sido el primado-recuerdo (*prime-boost*) o vacunación heteróloga, basada en un primado con vacuna ADN seguida de

un recuerdo con un vector viral codificando el mismo antígeno, o bien proteína recombinante, con obtención de un incremento en la respuesta de linfocitos T (Reyes-Sandoval and Ertl 2001; Rasmussen, Hofmann-Lehman et al. 2002). Uno de los vectores virales recombinantes empleados habitualmente en la dosis de recuerdo es el virus *Vaccinia* modificado de la cepa Ankara (MVA). Así, el empleo de la estrategia vacunal ADN-MVA ha optimizado los niveles de la respuesta celular T frente a patógenos intracelulares como el virus de la Inmunodeficiencia Humana (HIV) (Hanke, Blanchard et al. 1998), malaria (Schneider, Langermans et al. 2001) y tuberculosis (Gilbert, Moorthy et al. 2006), con incremento de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) secretores de IFN $\gamma$  responsables de la alta protección observada. Del mismo modo se han utilizado *Alphavirus* como recuerdo, que tras dos dosis de ADN codificando la Gn de RVFV mejoraba la respuesta celular y humoral en ratones confiriendo protección completa tras el desafío, siendo capaz de combinar ambas respuestas inmunes obtenidas con cada vector (Bhardwaj, Heise et al. 2010). Por último, resultados similares fueron observados con otros virus atenuados como el virus fowlpox y adenovirus no replicativos empleados como *boost* frente a diferentes enfermedades (Moore and Hill 2004).

## **5 Vacunas MVA.**

El virus MVA fue generado tras realizar más de 500 pases en cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (CEF). Durante este proceso de atenuación el virus perdió el 15% del genoma, alrededor de 30 kb, con respecto al virus *Vaccinia* original eliminándose genes específicos de rango de hospedador, virulencia y evasión de la respuesta inmune (McCurdy, Larkin et al. 2004). Pertenece a la familia *Poxviridae*, subfamilia *Chordopoxvirinae*, género *Orthopoxvirus*, y presenta un genoma ADN de doble cadena lineal con envuelta (McCurdy, Larkin et al. 2004; Jacobs, Langland et al. 2009). El MVA fue empleado ya en los años 1970 como vacuna frente a la viruela en Alemania en más de 100,000 personas, incluyendo personas mayores y niños, observándose una alta seguridad y una alta protección frente a la infección (Mayr 2003).

Actualmente, se utiliza como vector vacunal ya que es capaz de incorporar y expresar genes de gran tamaño bajo el control de promotores del VV sin pérdida de infectividad (Rimmelzwaan and Sutter 2009). La obtención del MVA recombinante es sencilla, y requiere de una única inserción en el genoma del vector mediante recombinación homóloga entre el genoma viral y el plásmido que contiene el gen o genes recombinantes localizados bajo el control de promotores específicos del VV (Staib, Drexler et al. 2004).

Tras la administración de la vacuna MVA recombinante se produce la infección en diferentes células, incluyendo células presentadoras de antígenos (APCs), donde se lleva a cabo tanto la expresión de las proteínas del vector como de la proteína de interés insertada sin generarse partículas infecciosas debido a la atenuación del virus. En primer lugar, se desarrolla una respuesta inmune innata frente al virus permitida por la ausencia de factores inmunomoduladores como los receptores solubles de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha/\beta$  y quimioquinas, que si son funcionales en el VV original. Posteriormente se desencadena una respuesta inmunitaria adquirida frente a las proteínas expresadas que da lugar a una estimulación específica de los linfocitos T, cuya población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> es la más estimulada (Gomez, Najera et al. 2008).

El empleo de MVA como vector vacunal presenta una serie de ventajas como su alta seguridad al no ser capaz de replicar ni sintetizar viriones maduros en la gran mayoría de la células de mamífero (Carroll and Moss 1997; Drexler, Heller et al. 1998; Okeke, Nilssen et al. 2006). Se ha demostrado experimentalmente que es avirulento en animales de laboratorio y primates no humanos incluso inmunodeprimidos, circunstancia que permite utilizar la vacuna con seguridad sin importar el estado inmune del animal (Meyer, Sutter et al. 1991; Stittelaar, Kuiken et al. 2001). Otra de las ventajas es su capacidad de generar frente al antígeno de interés una respuesta inmune tanto humoral como celular, sin interferencia con la existencia de una inmunidad previa frente al vector, siendo un virus genéticamente estable al localizarse exclusivamente en el citoplasma celular. Además, la administración de esta vacuna es muy versátil ya que pueden emplearse diferentes vías de inoculación tanto parenteral como oral. Por último, su producción es fácil no

requiriendo de altas medidas de biocontención para su producción (Drexler, Staib et al. 2004; Rimmelzwaan and Sutter 2009; Gomez, Najera et al. 2011).

Como inconvenientes al empleo como vacuna, se encuentra su producción en cultivos primarios/secundarios de CEF, y el requerimiento de altas dosis para lograr una inmunidad efectiva, no siendo esto ya un problema al existir actualmente laboratorios que distribuyen estas líneas celulares de forma estandarizada y controlada (Cottingham and Carroll 2013).

Existen numerosas vacunas basadas en el vector MVA en distintas fases preclínicas frente a enfermedades como HIV (Garcia, Bernaldo de Quiros et al. 2011), malaria (Moorthy, McConkey et al. 2003) o tuberculosis (Gilbert 2013), así como en ensayos de terapia frente a diferentes tipos de cáncer (Amato, Hawkins et al. 2010), donde se ha demostrado que la vacunación con MVA es segura y bien tolerada en el hombre, siendo capaz de inducir una respuesta inmune duradera en el tiempo mediada por Ac y linfocitos. El tipo de respuesta inmune inducida depende de diversos factores como dosis, vía de administración así como régimen de vacunación empleado.

Del mismo modo se han desarrollado vacunas de uso veterinario frente a diferentes enfermedades como el virus de la Peste Equina Africana (AHSV) (Chiam, Sharp et al. 2009; Alberca, Bachanek-Bankowska et al. 2014) e influenza equina en ponies (Breathnach, Rudersdorf et al. 2004), Peste de Pequeños Rumiantes (PPR) en cabras (Chandran, Reddy et al. 2010), y Leishmaniosis en perros (Ramos, Alonso et al. 2008), que al igual que en el hombre fueron seguras e inmunógenicas en diversas especies animales.

Generalmente, se emplean como *boost* tras realizar un primado con un vector vacunal diferente, con el fin de incrementar la respuesta de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> frente a una gran variedad de patógenos y así su nivel de protección. De esta manera, se han obtenido buenos resultados al realizar un primado con vacunas basadas en el virus fowlpox y adenovirus no replicativos frente a malaria (Gilbert, Schneider et al. 2002), con la vacuna Bacillus Calmette-Guerin (BCG) frente a la tuberculosis (McShane, Pathan et al. 2004), y con proteínas recombinantes de malaria previo al recuerdo con MVA (Dunachie, Walther et al. 2006).





## **IV OBJETIVOS**



La fiebre del Valle del Rift afecta tanto a animales como al hombre con una sintomatología muy variada que en algunos casos puede llegar a la muerte. La enfermedad esta confinada en África pero su introducción a otros continentes es posible con consecuencias impredecibles. Las vacunas empleadas se basan en la utilización de virus atenuados y/o inactivados, no estando aprobadas para su uso en el hombre o en el ganado en países no endémicos por sus efectos adversos. Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis ha sido la evaluación de vacunas seguras basadas en plásmidos ADN y el vector viral MVA expresando antígenos del RVFV, tanto en el modelo murino como ovino.

Para ello, se plantaron los siguientes objetivos específicos:

1. Generar vacunas MVA recombinantes codificando las glicoproteínas Gn y Gc, así como la nucleoproteína N del RVFV.
2. Estudiar la respuesta inmunológica tanto humoral como celular y la protección inducida por diferentes estrategias de inmunización basadas en vacunas ADN y/o MVA en el modelo murino.
3. Estudiar la inmunogenicidad y protección con la mejor estrategia vacunal obtenida en ratón en un modelo de infección ovino.



## **V MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1 CULTIVOS CELULARES.

### 1.1 Líneas celulares eucariotas:

-BHK-21; línea celular de fibroblastos de riñón de hámster lactante.

-Vero; línea celular epitelial de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

-DF-1 (Doug-Foster); línea celular de fibroblastos de embrión de pollo.

Las líneas celulares se mantuvieron en medio de DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium, High glucose 4,5g/l, with L-Glutamine*) (PAA Laboratories) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFBi, PAA), 1% de aminoácidos no esenciales MEM (NEAA, GIBCO Invitrogen), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (GIBCO Invitrogen), y 50 µg/ml gentamicina (PAA). El mantenimiento de los cultivos celulares se realizó en un incubador a 37°C, en una atmósfera del 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad. Estas líneas celulares fueron proporcionadas por el Servicio de Cultivos Celulares del CISA-INIA.

### 1.2 Cepa de *Escherichia coli* (E. coli):

-Top10, suministrada por Invitrogen.

-Bl21, suministrada por Novagen.

-JM109, suministrada por Clontech.

El cultivo de células bacterianas se realizó en medio líquido (LB Broth, Sigma) y en medio sólido (LB Agar, Sigma). Este medio fue suplementado con ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml.

## 2 VIRUS.

### 2.1 Cepa MP12 RVFV.

Es la cepa atenuada procedente de la cepa virulenta ZH548 (Caplen, Peters et al. 1985), cedida por el Centro Mundial de Referencia para virus emergentes y Arbovirus, en Galveston (TX, USA).

#### ➤ Generación y titulación del stock viral MP12-G2-P2 RVFV.

Se obtuvo a partir de una placa de lisis grande del MP12 RVFV seleccionada sobre células Vero y tras dos pases sucesivos del clon en la misma línea celular.



Para la producción del stock MP12-G2-P2 RVFV, se infectaron células Vero a una  $\text{moi}$  de 0,01 con el stock viral del primer pase. A los 3 días post-infección y tras observar un claro efecto citopático (ECP) se realizaron tres ciclos de congelación-descongelación recogiendo el ss conteniendo el virus después de centrifugar a  $1000\times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se tituló mediante ensayos de formación de placas en medio sólido. Para ello, células Vero sembradas en placas de 6 pocillos se infectaron por duplicado con diluciones seriadas en base 10 partiendo de  $10^{-1}$ , en un volumen final de 1 ml/pocillo. Tras 1 h de adsorción, se retiró el inóculo del pocillo y después de lavar se añadieron 2 ml/pocillo de una mezcla de: Agar Noble 0,6% (DIFCO BD), EMEM 1X (Lonza Biowittaker), 5% SFBi, 1% de NEAA, 2mM de L-glutamina (GIBCO Invitrogen), 100 U/ml penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  estreptomicina y 50  $\mu\text{g/ml}$  gentamicina. Después de 5 días a  $37^{\circ}\text{C}$ , las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído (Sigma) y cristal violeta (SERVA) al 2% (p/v) en PBS. Para calcular el título se contaron las placas de la mayor dilución posible y se estableció el número de pfu/ml de la muestra. El título del stock MP12-G2-P2 fue de  $5\times 10^5$  pfu/ml, empleándose este stock en ensayos de infección de animales así como en ensayos de ELISA, neutralización viral e inmunofluorescencia indirecta (IFI).

### ➤ Generación de un stock viral para ensayos de Western blot.

Para la obtención de antígeno viral, el ss conteniendo el virus MP12-G2-P2 se ultra-centrifugó a  $100000\times g$  durante 2 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . El pp se resuspendió en PBS estéril y la concentración de proteínas se cuantificó mediante el reactivo BCA Protein Assay Reagent (Pierce Biotechnology) según indicaciones del proveedor.

## 2.2 Aislados virulentos de RVFV.

Las cepas virulentas de origen sudafricano RVFV 56/74 y RVFV AR20368 proceden del Laboratorio Mundial de Referencia para la fiebre del Valle del Rift en Onderstepoort (Sudáfrica). La historia de pases de estos aislados se describe en la Tabla 3. Tras su amplificación en células BHK-21, se llevó a cabo la titulación mediante ensayos de formación de placas en medio sólido sobre células Vero como

se ha descrito anteriormente, obteniéndose un título para el RVFV 56/74 de  $1 \times 10^6$  pfu/ml, y para el aislado RVFV AR20368 de  $3 \times 10^4$  pfu/ml.

Además, se realizó la titulación en medio líquido sobre células Vero. Para ello, se prepararon diluciones seriadas del virus en base 10 partiendo de  $10^{-1}$ , en un volumen final de 100  $\mu$ l/pocillo. Tras 1 h de adsorción sobre células sembradas en placas de 96 pocillos, se retiró el inóculo y después de una incubación de 3 días a 37°C, las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído y cristal violeta al 2% (p/v) en PBS. El título de la dosis infectiva 50 de cultivo celular/ml (TCID<sub>50</sub>/ml) se calculó según el método de Reed and Muench, obteniéndose un título para el RVFV 56/74 de  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/ml.

**Tabla 3.** Historia de los aislados virulentos del RVFV. Adaptada de Busquets et al., 2010.

Nombre	Historia de pases	Año de aislamiento	Fuente	Referencia
RVFV 56/74 (WYJIUOWO)	#3 cer <sup>a</sup> #7 MDBK #2 BHK-21	1974	Vaca	Barnard and Botha (1977)
RVFV AR 20368	#1 VERO #6 MDBK #2 BHK-21	1981	Mosquito	Paweska et al.(2003), Wallace et al. (2006)

# : número de pases

<sup>a</sup> :células procedentes de embrión de pollo

### 3 GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES ADN.

Las vacunas basadas en plásmidos de ADN utilizadas en esta tesis, fueron generadas y caracterizadas previamente en nuestro grupo de investigación (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010), y son los plásmidos: pCMV-M4 que codifica las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV a partir del cuarto codón de iniciación ATG en fase y pCMV-N que codifica la nucleoproteína N de RVFV.

### **3.1 Generación de pCMV-M4 y pCMV-N**

Tras la obtención de pXLTOPO-4 y pXLTOPO-7, se procedió al subclonaje en el plásmido pCMV (Clontech) como se describe en Lorenzo et al., 2008 y Lorenzo et al., 2010. Los nuevos plásmidos generados fueron pCMV-M4 y pCMV-N. La purificación del plásmido de ADN se realizó con Genelute HP Plasmid Maxiprep Kit (Sigma), siguiendo las instrucciones del fabricante. Estas construcciones fueron llevadas a una concentración de 1,1 mg/ml, y utilizadas como vacunas ADN.

### **3.2 Ensayos de expresión *in vitro*.**

Se realizaron ensayos de transfección en BHK-21 con las construcciones generadas en pCMV empleando lipofectamina (Invitrogen) en una proporción 1:10 (ADN: lipofectamina). Tras una incubación de 3 h a 37°C, se retiró el medio de transfección y 24 h después, las células se fijaron con metanol 60%-acetona 40% y se realizaron ensayos de IFI.

Por otro lado, se analizaron los lisados de las células transfectadas por Western blot (WB) con el fin de detectar las proteínas expresadas. Para ello, se lisaron con tampón RIPA (150mM NaCl, 1%Tritón, 0.1% SDS y 50mM Tris pH 8) junto con inhibidor de proteasas (Roche).

Para la detección de las proteínas recombinantes se empleó como Ac primario un suero policlonal de ratón anti-RVFV (dilución 1/300).

## **4 GENERACIÓN DE MVA RECOMBINANTES (MVA<sub>r</sub>).**

### **4.1 Clonaje, amplificación y purificación de virus MVA<sub>r</sub>.**

En la Tabla 4 se muestran las vacunas MVA<sub>r</sub> empleadas en esta tesis. Las vacunas MVA-GnGc, MVA-N y su control MVA-GFP fueron generadas en el Viral Vector Core Facility del Instituto Jenner, Universidad de Oxford (Reino Unido), en colaboración con el laboratorio de la Dra Sarah Gilbert.

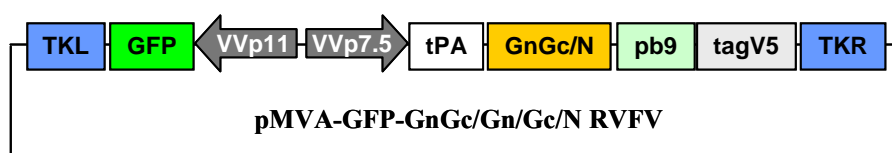
**Tabla 4.** MVAr generados frente a RVFV.

MVAr	Secuencia insertada
MVA-GnGc	GnGc Segmento M MP12 RVFV
MVA-Gn	Gn Segmento M MP12 RVFV
MVA-Gc	Gc Segmento M MP12 RVFV
MVA-N	N Segmento S MP12 RVFV

Los plásmidos pXLTOPO-N(7) y pXLTOPO-M(4) se utilizaron como molde para amplificar las ORF de la nucleoproteína N y de las glicoproteínas Gn y Gc, respectivamente.

Los productos de PCR obtenidos se ligaron en fusión con la secuencia líder activador de plasminógeno tisular humano (tPA, MDAMKRGLCCVLLLCGA VVSPSQEIHFRR) en la región N-terminal. Y en la C-terminal con el epítipo específico de linfocitos T H-2K<sup>d</sup> (pb9, SYIPSAEKI) proveniente de *Plasmodium berghei*, y el tagV5 (IPNPLLGLD).

Las secuencias obtenidas se ligaron dentro de un plásmido de transferencia (*shuttle*) circular pMVA-GFP derivado del vector pSC11, generándose los plásmidos pMVA-GFP-GnGc y pMVA-GFP-N RVFV. Estos plásmidos incluían GFP como gen reportero bajo el control del promotor tardío del VV p11, y el ORF correspondiente bajo el control del promotor temprano/tardío del VV p7.5, estando ambos flanqueados por el gen de la TK del MVA (Fig. 6).



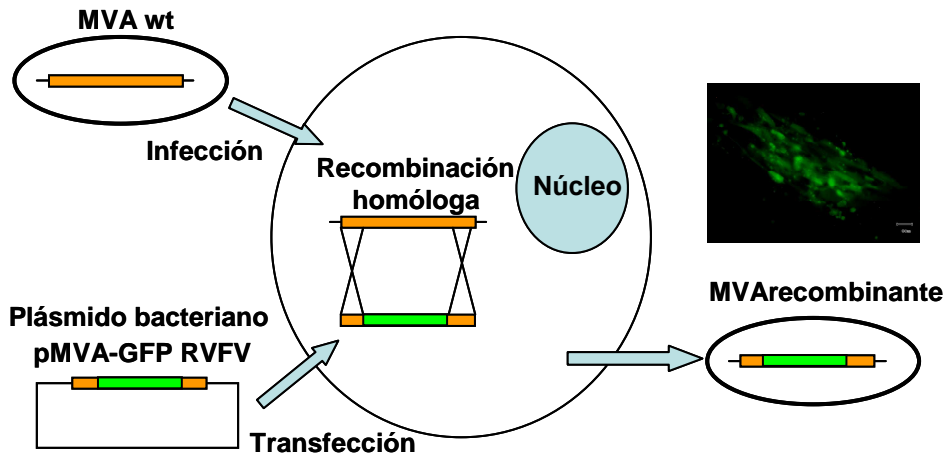
**Figura 6.** Esquema general del vector *shuttle* empleado para la obtención de MVAr. Los plásmidos generados fueron; pMVA-GFP-GnGc, pMVA-GFP-Gn, pMVA-GFP-Gc y pMVA-GFP-N RVFV.

Los plásmidos pMVA-GFP-Gn y pMVA-GFP-Gc se obtuvieron a partir del plásmido pMVA-GFP-GnGc RVFV empleando oligonucleótidos fosforilados (Tabla 5), delecionándose los genes de cada una de las glicoproteínas mediante PCR inversa convencional.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos fosforilados empleados para la generación de los plásmidos pMVA-GFP-Gn y pMVA-GFP-Gc RVFV.

Secuencia 5'-3'	Construcción pMVA-GFP
inicio pb9: (Phos)TCCTACATACCATCTGCC fin Gn: (Phos)GTGACACTGGTAATTTATCAG	pMVA-GFP-Gn
inicio Gc: (Phos)TGTTTCAGAACTGATTCAGG fin tPA: (Phos)AGATCCTCTTCTGAATTCG	pMVA-GFP-Gc

Los MVAr se obtuvieron mediante infección con MVA tipo parental (MVAwt) a una moi de 0,1 durante 2 h sobre células primarias de fibroblastos de embrión de pollo (CEF) o células DF-1, y posterior transfección con 1µg de ADN del plásmido de transferencia y 10µg de lipofectamina (Invitrogen) durante 3 h a 37°C (Fig. 7). A los 3 días de incubación se procesaron medio y células mediante 3 ciclos de congelación-descongelación, sonicación y centrifugación, empleándose el ss obtenido en ensayos de formación de placas en medio sólido con EMEM + 0,6% de agar noble sobre células DF-1. A las 72 h post-infección se seleccionaron placas de virus recombinante expresando GFP bajo observación en el microscopio de fluorescencia, que se procesaron de la forma descrita anteriormente. Este proceso de selección se realizó un total de 6 veces.



**Figura 7.** Esquema de infección-transfección para la obtención de MVAr.

Los diferentes MVAr se amplificaron en células DF-1 infectando a una moi de 0,1 durante 72 h hasta que el ECP fue evidente. El ss de células infectadas se obtuvo tras clarificar a 1000xg durante 30 min a 4°C, y éste se centrifugó a 40000xg durante 90 min a 4°C resuspendiéndose el pp en PBS. Por otra parte, las células infectadas se sometieron a 3 ciclos de congelación-descongelación, sonicación y centrifugación a 4000 rpm, 10 min a 4°C, recogiendo el ss rico en virus intracelular. El virus intracelular junto con el virus extracelular se purificaron conjuntamente sobre un colchón de sacarosa al 36% en PBS a 30000xg durante 90min a 4°C. El pp obtenido se resuspendió en PBS y se sonicó previo a su congelación a -80°C.

La titulación del stock viral se realizó mediante ensayos de formación de placas en medio líquido. Para ello, células DF-1 en placas de 12 pocillos se infectaron por duplicado con diluciones seriadas en base 10 partiendo de una dilución de  $10^{-2}$ , en un volumen de 500µl/pocillo. Tras una adsorción de 90 min, se retiró el medio y se incubó a 37°C durante 3 días. Para la visualización de las placas, las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído y 2% (p/v) de cristal violeta en PBS. El título obtenido para los diferentes stocks de MVAr varió entre  $10^8$  a  $10^9$  pfu/ml.

## 4.2 Ensayos de expresión en células infectadas.

La detección de la expresión de los antígenos recombinantes de los MVAr se llevó a cabo por WB e IFI. Para ello se infectaron células BHK-21 a una *moi* de 0,5 con los MVA generados, empleando como control negativo células infectadas con MVA-GFP y como control positivo células infectadas con MP12 RVFV. Tras una adsorción de 2 h a 37°C, se incubaron las células a 37°C.

Para el WB, los cultivos se lisaron a las 48 h con tampón RIPA junto con inhibidor de proteasas, y se procesaron en condiciones reductoras. Como Ac primario se empleó el AcMo de ratón anti-Gn 84a RVFV diluido 1/1000 y el Ac policlonal de conejo anti-Gc RVFV diluido 1/6000 cedidos por el Dr Martin Groschup (Friedrich-Loeffler-Institut FLI, Alemania), el AcMo 2B1 anti-N de RVFV (obtenido en nuestro laboratorio) diluido 1/500, y el AcMo anti-tagV5 clon SV5-Pk1 (Serotec) diluido 1/100. Los Ac secundarios conjugados con *Horseradish peroxidase* (HRPO) utilizados en el ensayo se muestran en la Tabla 6.

Para la IFI, las células se fijaron a las 24 h con paraformaldehído al 4% en PBS durante 10 min en hielo y 20 min a RT, bloqueando la autofluorescencia con 50mM NH<sub>4</sub>Cl en PBS durante 5 min. A continuación, las células se permeabilizaron y bloquearon previo al empleo del AcMo anti-tagV5 clon SV5-Pk1 (Serotec) a una dilución 1/100. Como Ac secundario se utilizó un Ac anti-ratón IgG (H+L) conjugado con Alexa Fluor 594 (Sigma) diluido 1/1000, y los núcleos se tiñeron de azul con el colorante Hoechst.

## 5 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.

### 5.1 Ratones.

Se emplearon tres cepas de ratones *inbred*; BALB/c HSD-Ola H-2K<sup>d</sup> (Harlan Ltd), 129Sv/Ev tipo parental (wt) H-2<sup>b</sup> (B&K Universal) y ratones transgénicos con el mismo fondo genético deficientes en la subunidad  $\beta$  del receptor para IFN- $\alpha/\beta$  denominados 129Sv/Ev IFNAR<sup>-/-</sup> (B&K Universal).

El régimen de luz-oscuridad fue alterno cada 12 h, a una temperatura ambiente de 22°C, proporcionándose la comida y la bebida *ad-libitum*. El trabajo con ratones se

realizó bajo un BSL3, y antes de ser desafiados con la cepa virulenta de RVFV se trasladaron a un BSL3+.

Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados y supervisados por el Comité de Bioética y Bioseguridad del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), siguiendo las guías regulatorias de la Directiva del Consejo de la Comunidad Europea 86/609/EEC.

Las rutas de inoculación empleadas en ratones fueron la vía intramuscular (IM) en ambas patas traseras (músculo tibial anterior) en un volumen total de 100µl para vacunas ADN, y la vía intraperitoneal (IP) para la vacunación con MVAr y desafío en un volumen de 200µl.

Las muestras de suero se obtuvieron tanto predesafío a los 15 días tras la última vacunación como post-desafío, siendo descomplementados e inactivados a 56°C durante 1 h previo a su empleo en ensayos *in vitro*. Además, se tomaron muestras de sangre completa en EDTA a 3, 6, 9 y 13 dpi para los estudios de viremia. Ambas muestras fueron recogidas mediante punción de la rama submandibular

## 5.2 Ovejas.

Se emplearon corderos de la raza Ripollesa de 5-7 semanas de edad de ambos sexos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Ética y Bienestar Animal de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) en cumplimiento con la directiva de la UE 2010/63/EU para la experimentación animal. Los animales procedían de una granja libre de brucelosis, y una vez destetados y desinsectados se alojaron en un box BSL-3 del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA-Barcelona). La alimentación siguió procedimientos habituales de granjas convencionales con suministro de agua *ad libitum*.

La vía de inoculación fue subcutánea (SC) próximo al ganglio pre-escapular situado detrás del codo en un volumen de 1 ml, y se extrajo sangre de la vena yugular.

Se recogieron tanto muestras de sangre con EDTA así como hisopos nasales y bucales procesados en tampón de lisis o DMEM a partir de 1 dpi cada dos días con el fin de detectar virus, mientras los sueros fueron recogidos a 0, 5, 9 y 16 dpi.



## 6 ENSAYOS DE ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA:

### 6.1 Ensayos de respuesta inmunológica humoral:

#### ➤ Ensayos de Western blot (WB).

Los lisados de células infectadas o transfectadas, así como el virus MP12 RVFV se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) en tampón de Laemmli en condiciones desnaturalizantes. A continuación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Nitrocellulose Transfer Membrane, Whatman) que se bloquearon con PBS + 5% (p/v) leche en polvo desnatada a 4°C ON.

Posteriormente, la membrana se incubó con el Ac primario correspondiente diluido durante 1 h a RT, y tras 3 lavados se añadió el Ac secundario conjugado con HRPO correspondiente (Tabla 6) durante 1 h. Para la detección de inmunocomplejos se añadió el sustrato *Amersham ECL Western blotting detection system* (GE Healthcare), y se reveló por autorradiografía.

**Tabla 6.** Anticuerpos secundarios conjugados con HRPO empleados en WB.

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución
Anti-ratón hecho en cabra IgG, IgM, IgA-HRPO	Sigma	1/6000
Anti-conejo hecho en cabra IgG (H+L)-HRPO	Bio-Rad	1/4000

#### ➤ *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA).

##### • ELISA de captura convencional.

Se tapizaron placas de ELISA (High Binding, Costar) con el Ac policlonal de conejo anti-RVFV a una dilución 1/2000 en tampón carbonato-bicarbonato pH 9,6 (Sigma), y se incubaron a 4°C ON. Tras bloquear con PBS + 5% (p/v) leche durante 1 h a 37°C, se añadió el virus MP12-G2-P2 RVFV con un título de  $5 \times 10^5$  pfu/ml diluido 1/20 en PBS + 2% (p/v) leche. Una vez incubado a 37°C durante 1 h, las placas se lavaron 3 veces con PBS + 0.1 % (v/v) Tween 20, y se incubaron con las muestras de suero en solución de dilución durante 1 h a 37°C. A continuación, las placas se lavaron tres veces y se utilizó el Ac secundario de cabra anti-ratón IgG, IgM, IgA conjugado con HRPO (Sigma) diluido 1/2000, durante 1 h a 37°C. Por

último, tras lavar 3 veces se añadió 50 µl/pocillo del sustrato TMB (3, 3', 5, 5'-Tetramethyl-benzidine Liquid Substrate, Supersensitive, Sigma) y se frenó la reacción a los 10 min con 50 µl/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro FLUO Star Omega (BMG LABTECH) a 450nm.

- **ELISA de competición ID-VET®.**

Este ensayo de diagnóstico está basado en la detección de Ac específicos frente a la nucleoproteína N de RVFV. Brevemente, consiste en el empleo de placas de ELISA ya tapizadas con antígeno recombinante y el empleo de un AcMo conjugado con una enzima. Los sueros de las ovejas se analizaron con este kit siguiendo las indicaciones del fabricante.

➤ **Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFI).**

Para la detección de proteínas virales se emplearon células Vero infectadas con MP12-G2-P2 RVFV a una moi de 0,03. Con el fin de confirmar la funcionalidad de los plásmidos generados se llevaron a cabo ensayos de transfección empleando células BHK-21. Las células una vez fijadas y permeabilizadas con metanol 60%-acetona 40% se incubaron con las muestras de suero a la dilución ensayada. Tras 3 lavados con PBS, se añadió el Ac secundario correspondiente (Tabla 7) y las muestras se observaron bajo microscopio de fluorescencia (Olympus CKX 41).

**Tabla 7.** Anticuerpos secundarios empleados en IFI.

Anticuerpo secundario	Casa comercial	Dilución
Anti-ratón hecho en cabra IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	Invitrogen	1/1500
Anti-ratón hecho en cabra IgG (H+L)-Alexa Fluor 594	Sigma	1/1000

➤ **Ensayos de neutralización viral (VNT) en fase líquida.**

Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las muestras de suero en DMEM 2% SFBi, que se incubaron con 100 pfu de la cepa MP12-G2-P2 RVFV en un volumen equivalente de 50 µl durante 1 h a 37°C. A continuación, los sueros

incubados con el virus se añadieron sobre células Vero sembradas en placa de 96 pocillos. Tras 3 días de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído y cristal violeta al 2% (p/v) en PBS. Para establecer el VNT<sub>50</sub>, se obtuvo el inverso de la dilución del suero más alta en el que se observaba un 50% de reducción del efecto citopático obtenido en las células infectadas sin suero.

## 6.2 Ensayos de respuesta inmunológica celular.

Para el estudio de este tipo de respuesta, se utilizaron esplenocitos de ratones previamente inmunizados o desafiados según el caso. Brevemente, una vez extraídos los bazo, estos fueron macerados sobre un filtro de nylon de 70µm (BD Falcon), y tras un lisado con cloruro amónico 0,85% (p/v) para retirar eritrocitos y varios lavados con medio RPMI 1640 (PAA), los esplenocitos se resuspendieron en medio RPMI completo suplementado con 10% SFBi, 1% NEAA, 2mM L-Glutamina (GIBCO Invitrogen), 20mM HEPES (GIBCO Invitrogen), 50µM β-mercaptoetanol (GIBCO Invitrogen), 100 U/ml penicilina y 100µg/ml estreptomicina, y 50µg/ml gentamicina.

Además, se obtuvieron leucocitos de sangre periférica (PBLs) de ratón a partir de muestras de sangre con EDTA procedentes de animales inmunizados. Las muestras se lisaron con cloruro amónico 0,85% (p/v) y tras varios lavados con medio, las células se resuspendieron en medio completo.

### ➤ Péptidos.

Los péptidos empleados en este trabajo se seleccionaron gracias a la aplicación bioinformática “immunepitope.org” realizándose una búsqueda *in silico* de secuencias peptídicas de entre 8-10 aa, dentro de la secuencia primaria de GnGc y N, capaces de unirse con cierta afinidad al MHC de clase I de ratón de haplotipo H2-K(D)<sup>d</sup>. Se sintetizaron un total de 28 péptidos de 9 aa de MHC de clase I, 15 para las glicoproteínas Gn y Gc (Tabla 8) y 13 para la nucleoproteína N de MP12 RVFV (Tabla 9), seleccionados por la puntuación de afinidad teórica más alta, y aquellos con secuencias superpuestas y afinidad similar por la puntuación de degradación

proteosómica teórica mayor. Los péptidos se sintetizaron con un 95% de pureza a una concentración de 5 mg/ml siguiendo técnicas convencionales (Proteogenix).

**Tabla 8.** Péptidos teóricos de las glicoproteínas GnGc de RVFV restringidos a MHC clase I.

Péptido n°	Secuencia 9 aa	Posición en ORF	Haplotipo(s) H-2 (predicción)
1	LYRALKAI	73-81	K <sup>d</sup>
2	PPHKRVGI	106-114	D <sup>d</sup>
3	TYAGACSSF	183-191	K <sup>d</sup>
4	SYAHRRTL	205-213	K <sup>d</sup>
5	CSHANGSGI	434-442	K <sup>d</sup> , D <sup>b</sup>
6	LVLGNPAPI	658-666	D <sup>b</sup>
7	SYASACSEL	686-694	K <sup>d</sup>
8	CGGWGCGCF	818-826	D <sup>b</sup> , D <sup>d</sup>
9	CFNVNPSC	825-833	D <sup>b</sup>
10	SCLFVHTYL	831-839	K <sup>d</sup>
11	SGSNSFSFI	898-906	K <sup>d</sup>
12	ESPGKGYAI	907-915	D <sup>d</sup>
13	SYKPMIDQL	955-963	K <sup>d</sup>
14	GGPLKTILL	1154-1162	D <sup>d</sup>
15	LYVALSIGL	1165-1173	K <sup>d</sup>

**Tabla 9.** Péptidos teóricos de la nucleoproteína N de RVFV restringidos a MHC clase I.

Péptido n°	Secuencia 9 aa	Posición en ORF	Haplotipo(s) H-2 (predicción)
1	NYQELAIQF	3-11	K <sup>d</sup>
2	AQAVDRNEI	13-21	K <sup>d</sup> , D <sup>b</sup>
3	RGNKPRRMM	64-72	D <sup>d</sup>
4	EGKATVEAL	78-86	D <sup>d</sup>
5	EALINKYKL	84-92	D <sup>b</sup>
6	EGNPSRDEL	94-102	D <sup>d</sup>
7	WLPVTGTTM	125-133	D <sup>d</sup> , D <sup>b</sup>
8	SFAGMDVPS	148-156	K <sup>d</sup>
9	LYLLQFSRV	171-179	K <sup>d</sup>
10	YLLQFSRVI	172-180	K <sup>d</sup> , D <sup>b</sup>
11	FTQPMNAAV	196-204	K <sup>d</sup>
12	NAAVNSNFI	201-210	D <sup>b</sup>
13	SHEKRREFL	210-218	D <sup>d</sup>

➤ ***Enzyme-linked immunosorbent SPOT (ELISPOT).***

Mediante ensayos de ELISPOT se estudió el número de células secretoras de IFN- $\gamma$  procedentes de esplenocitos de ratones, o bien de PBLs, en presencia de diferentes estímulos. Para ello, se tapizaron placas de 96 pocillos con filtros de immobilon-P (Millipore) previamente permeabilizadas según indicaciones del fabricante con 50  $\mu$ l/pocillo del Ac de captura hecho en rata anti-IFN $\gamma$  de ratón AN18 (BD Pharmingen), a una concentración de 2,5  $\mu$ g/ml diluido en tampón carbonato/bicarbonato. Tras una incubación ON a 4°C y bloqueo con medio completo durante 1 h a 37°C, las placas se sembraron por duplicado con  $4 \times 10^4$  células/pocillo y se estimularon en presencia de 5  $\mu$ g/ml de cada péptido. Como control negativo del ensayo se utilizó medio completo y como control positivo PHA (Sigma) a una concentración final de 5  $\mu$ g/ml. Además, como control positivo específico del antígeno recombinante para las vacunas MVA se empleó el epítipo pb9 a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml.

Tras una incubación de 18-20 h a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, las placas se lavaron primero con H<sub>2</sub>O destilada seguida de 6 lavados con PBS. Después, se añadió el AcMo anti-IFN- $\gamma$  de ratón biotinilado R46A2 (BD Pharmingen) a una concentración de 0,5  $\mu$ g/ml, durante 2 h a RT, en oscuridad y una vez lavadas las placas se incubaron con estreptavidina conjugada con HRPO (BD Pharmingen) a una concentración de 1  $\mu$ g/ml durante 1 h a RT. Finalmente, tras el último lavado se visualizaron los spots con el sustrato 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC Substrate Set BD ELISPOT) durante 10 min, lavándose posteriormente con H<sub>2</sub>O. El conteo de los spots se realizó mediante el empleo de una lupa binocular. Los datos se representaron como células formadoras de spots (SFC) por cada 10<sup>6</sup> esplenocitos, restando a cada valor el fondo obtenido con medio solo.

➤ ***Marcaje intracelular de citoquinas (ICCS).***

Para ello, se estimularon 10<sup>6</sup> células por pocillo sembrados en placa de 96 pocillos con 5  $\mu$ g/ml de los péptidos y Brefeldina A (BFA) (Sigma) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 6 h a 37°C en 5% CO<sub>2</sub>. Como control negativo del ensayo se utilizó medio y como control positivo se empleó PMA (Phorbol 12-

myristate 13-acetate) (Sigma) e ionomicina (Sigma) a una concentración de 50 ng/ml y 500 ng/ml respectivamente, incubándose durante la última hora con BFA.

Una vez estimuladas las células, se llevó a cabo el marcaje de superficie. Para ello, las células se centrifugaron, se lavaron y se incubaron con los Ac anti-CD4-FITC (BD Pharmingen) y anti-CD8a-PerCP (BD Pharmingen) a una concentración de 2,5 µg/ml y 1 µg/ml respectivamente. A continuación, las células se fijaron durante 20 min en hielo con 2% formalina (Sigma) en PBS, y se permeabilizaron y lavaron con la solución PBS + 1% SFBi + 0,1% saponina. Por último, se realizó el marcaje intracelular con el Ac anti-IFN $\gamma$ -PE (BD Pharmingen) a 1 µg/ml durante 30 min en hielo y oscuridad. Las células una vez lavadas y resuspendidas en solución de fijación se transfirieron a tubos de citometría. Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson) y se analizaron mediante FlowJo (TreeStar 7.6.5 software).

### **6.3 Ensayos de detección de interleucinas (IL).**

Con el fin de analizar la presencia de citoquinas inducidas tras la vacunación se incubaron *pools* de 10<sup>6</sup> células en placas de 24 pocillos en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 de las glicoproteínas Gn y Gc a una concentración de 5 µg/ml a 37°C, recogiénose ss a diferentes tiempos. Como control negativo del ensayo se utilizó medio y como control positivo ConA a una concentración final de 2 µg/ml. Las citoquinas ensayadas fueron IL-2, IL-4, IL-5 y IL-6.

Para su cuantificación, se tapizaron placas de ELISA (High Binding, Costar) con el Ac de captura anti-IL de ratón correspondiente (BD Pharmingen) a una concentración de 2,5 µg/ml a 4°C ON. Después del bloqueo con PBS + 0,05% (v/v) Tween 20 + 0,1% (p/v) BSA, se añadieron 100 µl/pocillo de la muestra y tras incubar 2 h a RT se añadió el Ac anti-IL de ratón biotinilado correspondiente (BD Pharmingen) a una concentración de 0,5 µg/ml durante el mismo tiempo. Por último, las placas se incubaron con la estreptavidina conjugada con HRPO (BD Pharmingen) a una concentración de 0,5 µg/ml durante 1 h a RT y se revelaron con el sustrato TMB (Sigma) y con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro FLUO Star Omega (BMG LABTECH) a 450nm. Como control

del ensayo se emplearon diferentes concentraciones de IL de ratón para generar una curva standard, y así correlacionar la densidad óptica obtenida con la concentración de la IL correspondiente.

#### **6.4 Ensayos de detección de IFN- $\alpha/\beta$ .**

Para la detección de IFN de tipo I se emplearon muestras de suero de ratones 129Sv/Ev wt recogidos a diferentes tiempos tras la inmunización con una única dosis de  $10^7$  pfu de MVA-GnGc por vía IP. La presencia de IFN- $\alpha/\beta$  se estudió mediante ensayos de actividad funcional y de cuantificación por ELISA.

##### **➤ Ensayos de actividad funcional.**

Los niveles en suero de IFN- $\alpha/\beta$  biológicamente activo fueron determinados empleando un virus sensible a esta citoquina, el virus de la Estomatitis Vesicular (VSV cepa Indiana), en un bioensayo de efecto citopático sobre la línea celular de ratón procedente de tejido conectivo denominada L929.

Para ello, se incubaron células L929 sembradas en placas de 96 pocillos con las diluciones seriadas en base 2 de los sueros de los animales inmunizados y no inmunizados durante 24 h, y a continuación se infectaron con 100 TCID<sub>50</sub> del VSV. Tres días después de la infección, las células se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído y cristal violeta al 2% (p/v) en PBS. El título de IFN- $\alpha/\beta$  en suero se expresó como la dilución del suero en la que se observaba un 50% de inhibición de la infección.

##### **➤ Ensayos de cuantificación de IFN- $\alpha$ .**

Los niveles de esta citoquina en suero se cuantificaron mediante ensayos de ELISA comercial para IFN- $\alpha$  de ratón (PBL Interferon Source), según indicaciones del proveedor. Diferentes concentraciones de IFN- $\alpha$  de ratón se emplearon para generar una curva standard, y así correlacionar la densidad óptica obtenida con la concentración de IFN- $\alpha$ . El límite de sensibilidad del ensayo se estimó en 25 pg/ml.

## **7 DETECCIÓN VIRAL.**

Con el fin de estudiar los niveles de viremia en sangre, tanto ratones como ovejas fueron sangrados a diferentes tiempos tras el desafío viral. Además, se recogieron muestras de hisopos nasales y bucales de las ovejas. Los ensayos realizados se basaron en la detección de virus infeccioso mediante aislamiento viral, así como en la presencia de ARN viral a través de ensayos de PCR.

### **7.1 Ensayo de aislamiento viral.**

Para su realización, se añadieron 400 µl de H<sub>2</sub>O estéril a 50 µl de sangre completa durante 5 min para la lisis de eritrocitos. Después se complementó con 50 µl de PBS 10X para la recuperación de las condiciones fisiológicas, obteniéndose así una dilución 1/20 de la muestra. A continuación, se prepararon las muestras por cuadruplicado a partir de una dilución 1/200 en base 2, y se añadieron a células Vero sembradas en placas de 96 pocillos. Tras una adsorción de 90 min se retiró el ss y se añadió 200 µl/pocillo de medio fresco. A los 6 días de incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, las placas se fijaron y tiñeron con 10% (v/v) de formaldehído y cristal violeta al 2% (p/v) en PBS, y se calculó el título de TCID<sub>50</sub>/ml según el método de Reed and Muench. Para los hisopos nasales y bucales, se realizaron diluciones seriadas de la muestra en base 2 a partir de la dilución 1/2, siguiendo el protocolo anterior.

### **7.2 Detección de ARN viral.**

#### **➤ Ensayos de PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR).**

En primer lugar, se realizó la extracción de ARN a partir de 50 µl de sangre completa con Tri-reagent® (Sigma) según indicaciones del fabricante. Después, se sintetizó el ADNc a partir de 100 ng de ARN para el segmento S de RVFV con el oligonucleótido NS2g (Sigma) 5'-TGATTTGCAGAGTGGTCGTC-3' a 10 µM y dNTPs 10 mM (Invitrogen) a 65°C durante 5 min. A continuación, se añadió la enzima Super Script III RT (Invitrogen) y se incubó a 50°C durante 1 h, inactivándose la reacción a 70°C durante 15 min.

Posteriormente, se realizó la RT-qPCR con el ADNc, Master Mix Brilliant QPCR (Stratagene), y oligonucleótidos para el segmento S con secuencia de avance



5'-TTCTTTCAGATTGGGGAACCTTGT-3' y con secuencia reversa 5'-CGGACTTGGAGACTTTGCATCA-3' a una concentración final de 600 nM.

El programa de PCR realizado en el equipo MX3005P (Stratagene) fue de 1 ciclo de 10 min a 95°C, 40 ciclos de 30 seg 95°C, 40 seg 60°C y 40 seg 72°C, con curva de disociación de 1 ciclo de 1 min 95°C, 30 seg 55°C y 30 seg 95°C.

Los resultados se analizaron mediante el programa Mxpro (Stratagene), y se empleó el standard obtenido a partir del segmento S de RVFV para el cálculo del número de moléculas y el establecimiento de Ct (Ciclo umbral) de cada muestra.

#### ➤ **Ensayos de PCR cuantitativa retrotranscriptasa (one-step qRT-PCR).**

La extracción de ARN de los hisopos nasales y bucales se realizó con Trizol® (Invitrogen), y de la sangre completa con Tri-reagent® (Sigma), según indicaciones del proveedor. El ARN de RVFV se detectó mediante el empleo de *one-step* qRT-PCR con sonda TaqMan específica para el segmento L de RVFV, como se había descrito previamente (Busquets, Xavier et al. 2010).

### **8 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.**

El análisis de la supervivencia de los animales tras el desafío con RVFV se realizó mediante el test log rank (Mantel-Cox).

Los datos de cada grupo vacunado de ratones asumían una distribución paramétrica y fueron analizados usando un análisis de la varianza (ANOVA) de un solo factor, empleándose para la comparación entre grupos un test múltiple post hoc de Tukey o bien un test de Dunnet. Sin embargo, los datos de cada grupo de ovejas seguían una distribución no paramétrica (test Kruskal-Wallis), empleándose en este caso un test múltiple post hoc de Dunn.

Todos los análisis fueron realizados empleando el programa GraphPad 5.0 software (San Diego, CA). Las diferencias fueron significativas cuando el valor de  $p < 0,05$ .

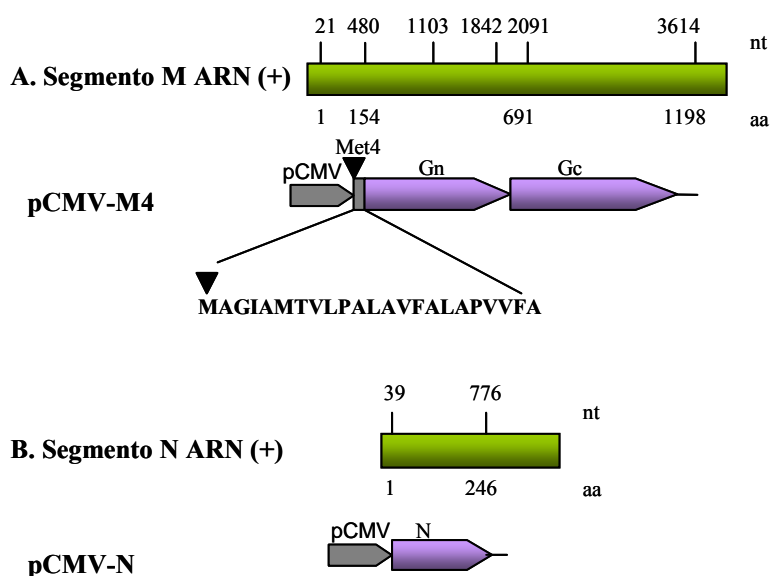
## **VI RESULTADOS**



# 1 OBTENCIÓN DE VACUNAS ADN/MVA Y CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN ANTIGÉNICA.

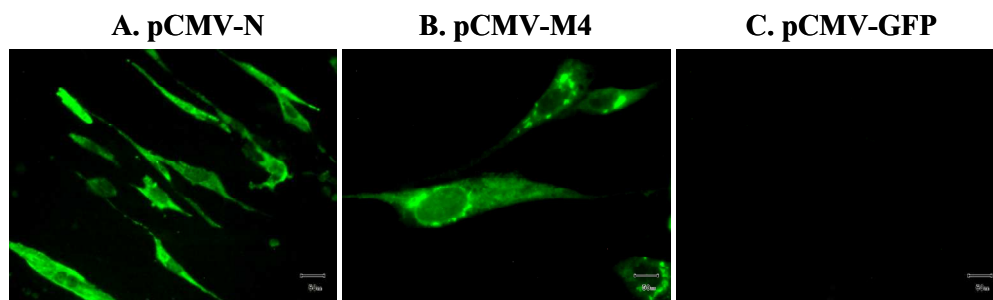
## 1.1 Obtención y expresión antigénica de las vacunas ADN.

Las vacunas ADN utilizadas en los experimentos de inmunización frente a RVFV fueron pCMV-M4 codificando las glicoproteínas Gn y Gc a partir del cuarto codón de iniciación ATG, o bien pCMV-N expresando la nucleoproteína N de RVFV (Fig. 8) (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010).



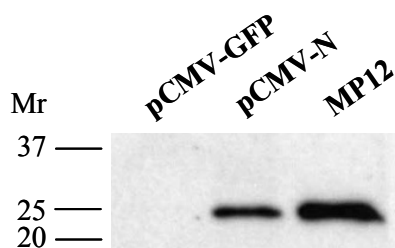
**Figura 8.** Esquema de los plásmidos pCMV-M4 (A) y pCMV-N (B). Los genes insertados corresponden a la secuencia de la poliproteína GnGc, así como la nucleoproteína N, bajo el control del promotor hCMV-IE. Adaptado de Lorenzo et al., 2008, y Lorenzo et al., 2010.

Una vez confirmada la correcta inserción y orientación de los genes de interés mediante secuenciación, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para conocer la funcionalidad de dichas construcciones en cuanto a su capacidad de expresión. Para ello, se transfectaron células BHK-21 con los diferentes plásmidos donde se empleó como control negativo del ensayo el plásmido que expresaba el gen de la GFP (pCMV-GFP). En la Figura 9 se puede observar la expresión de las proteínas virales detectadas mediante IFI con un suero policlonal de ratón anti-RVFV.



**Figura 9.** IFI sobre células BHK-21 transfectadas con los diferentes plásmidos. El suero policlonal de ratón anti-RVSV se utilizó para el estudio de la expresión de los plásmidos pCMV-N (A), pCMV-M4 (B) y pCMV-GFP (C).

Además, se realizaron WB con lisados de células transfectadas con el plásmido pCMV-N (Fig. 10). Tras la incubación con un suero policlonal de ratón anti-RVSV, se observó una banda específica de 27 kDa coincidiendo con el tamaño de la nucleoproteína N viral.



**Figura 10.** WB con lisados de células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pCMV-N y pCMV-GFP. Como Ac primario se empleó un suero policlonal de ratón anti-RVSV, y como control positivo del ensayo el virus MP12 RVSV.

Los resultados obtenidos mostraron la correcta funcionalidad de las construcciones generadas así como una alta eficacia de transfección. La nucleoproteína N así como las glicoproteínas Gn y Gc expresadas por sus plásmidos correspondientes fueron reconocidas por Ac policlonales anti-RVSV en ensayos de IFI y WB, mientras que las células transfectadas con el plásmido control pCMV-GFP fueron negativas. De esta forma se confirmó que los plásmidos generados eran capaces de inducir la síntesis de las proteínas del virus con una conformación similar

a las sintetizadas tras una infección, como ya se había descrito por Lorenzo et al., 2008 y Lorenzo et al., 2010.

### **1.2 Obtención y expresión antigénica de las vacunas MVA.**

Las vacunas generadas frente a RVFV basadas en el vector viral atenuado MVA fueron MVA-GnGc, MVA-Gn, MVA-Gc y MVA-N. Estas construcciones contenían en su genoma los genes que codifican las glicoproteínas virales GnGc, la glicoproteína Gn a partir del cuarto ATG, la glicoproteína Gc y la nucleoproteína N de RVFV, respectivamente.

Una vez clonado el virus recombinante, se analizó la capacidad infectiva del mismo. Los MVAr generados fueron capaces de crecer en cultivos de células DF-1 con obtención de títulos virales de  $10^9$  pfu/ml. El tamaño de placa formado fue similar en todos ellos salvo para el virus MVA-Gc que producía una placa viral de menor tamaño, que fue asociado a una menor eficiencia en la replicación con respecto al virus no recombinante pudiendo estar relacionado con la expresión de la glicoproteína Gc en ausencia de la Gn durante la infección viral.

Se estimaron los tamaños teóricos para la ORF resultante que fueron de 62,5 kDa para Gn (excluyendo la secuencia líder tPA), 57,4 kDa para Gc (incluyendo el pb9 y el tag V5) y de 33,2 kDa para N (incluyendo el pb9 y el tag V5).

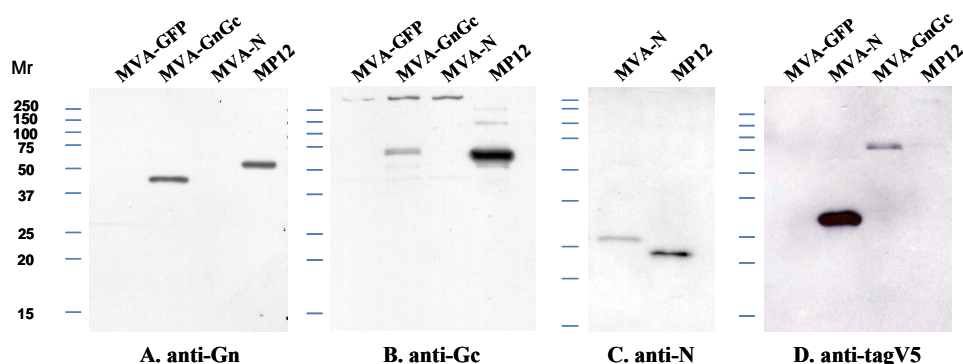
La glicoproteína Gc expresada por los vectores MVA-GnGc y MVA-Gc era reconocida por el Ac policlonal anti-Gc de RVFV y presentaba un tamaño cercano a 60 kDa que coincidía con el estimado, pero superior a la glicoproteína Gc del virus MP12 RVFV debido a la incorporación del tagV5 y el pb9 (Fig. 11B y 12B). Además, se observaron dos bandas en el lisado de MVA-Gc reconocidas por el anti-Gc, una que coincidía con el tamaño de la Gc de MP12 RVFV y una proteína truncada de menor tamaño (Fig. 12B).

Por otra parte, la nucleoproteína N expresada por el vector MVA-N era reconocida por el AcMo anti-N 2B1, y se detectaba por encima de la nucleoproteína viral al incorporar tanto el epítipo pb9 como el tagV5 (Fig. 11D).

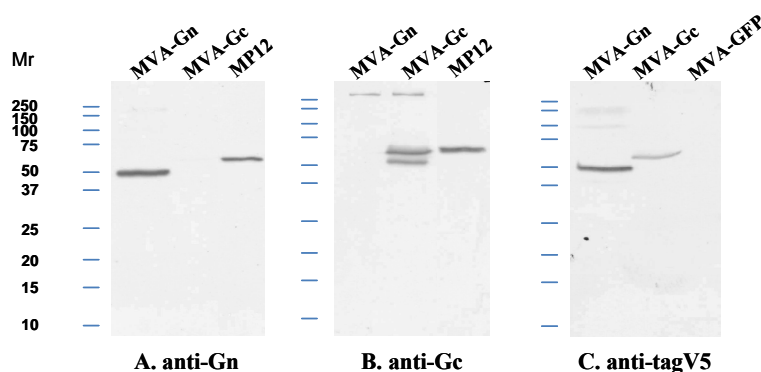
Sin embargo, la glicoproteína Gn expresada tanto por el MVA-GnGc como el MVA-Gn presentaba un Mr inferior a 50 kDa, por debajo de la Gn de MP12 RVFV

(Fig. 11A y 12A). Estas diferencias pueden ser debidas al distinto procesamiento post-traduccional de la Gn en la célula infectada con MVA en comparación con el virus.

Por último, la señal obtenida con el AcMo anti-tagV5 fue mayor para la nucleoproteína N expresada por MVA-N con respecto a la Gc codificada por MVA-GnGc y MVA-Gc (Fig. 11D y 12C), lo que sugería una expresión más eficiente de la nucleoproteína N.

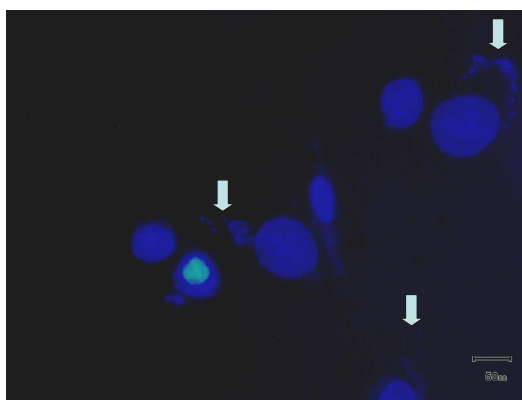


**Figura 11.** WB realizados con lisados de células BHK-21 infectadas con MVA-GnGc y MVA-N. Como control negativo se utilizó MVA-GFP, y como control positivo el virus MP12 RVFV. Los Ac empleados fueron: AcMo anti-Gn (A), Ac policlonal anti-Gc (B), AcMo anti-N (C) y AcMo anti-tagV5 (D).



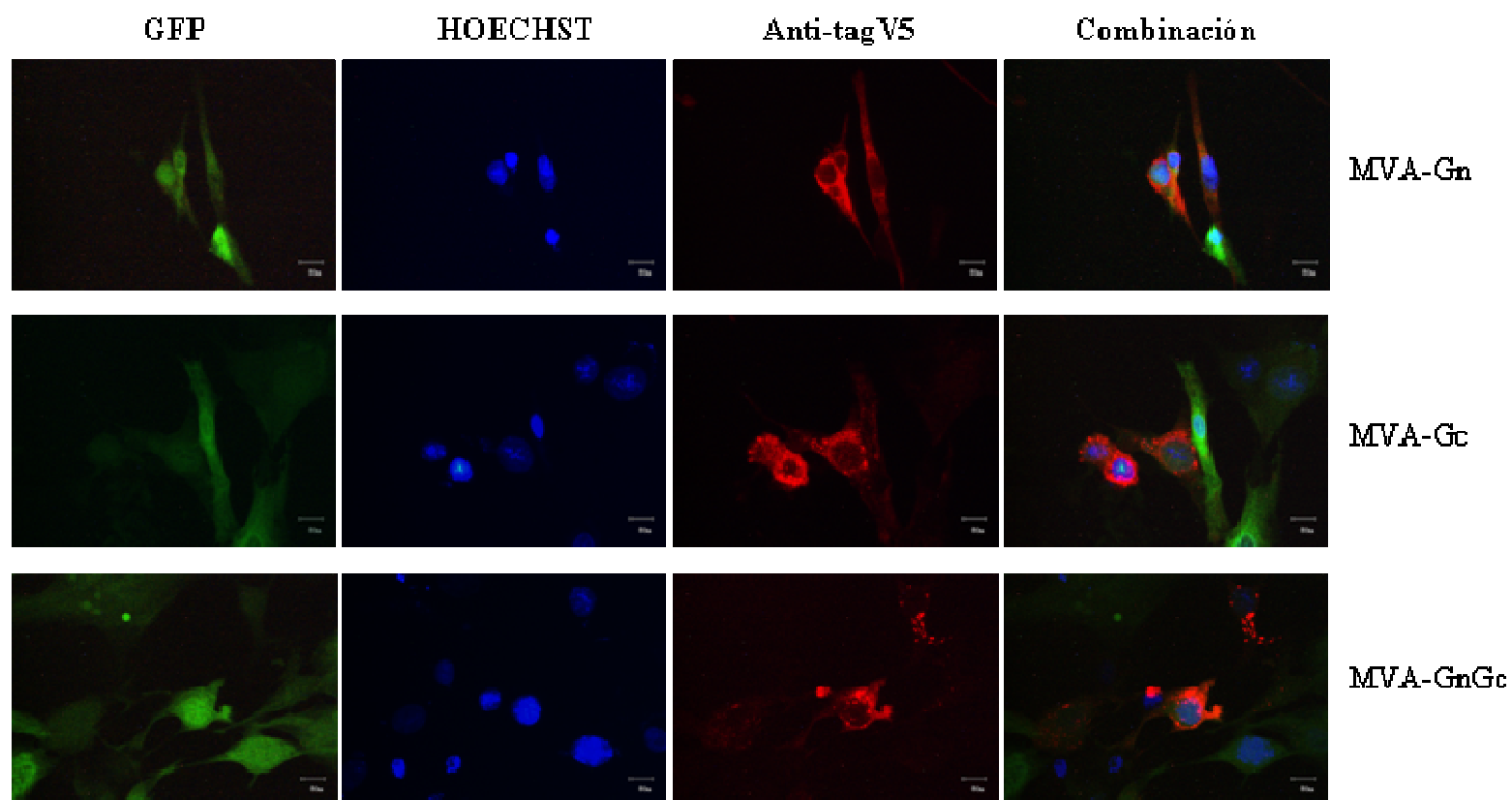
**Figura 12.** WB realizados con lisados de células BHK-21 infectadas con MVA-Gn y MVA-Gc. Como control negativo se utilizó MVA-GFP, y como control positivo el virus MP12 RVFV. Los Ac empleados fueron: AcMo anti-Gn (A), Ac policlonal anti-Gc (B) y AcMo anti-tagV5 (C).

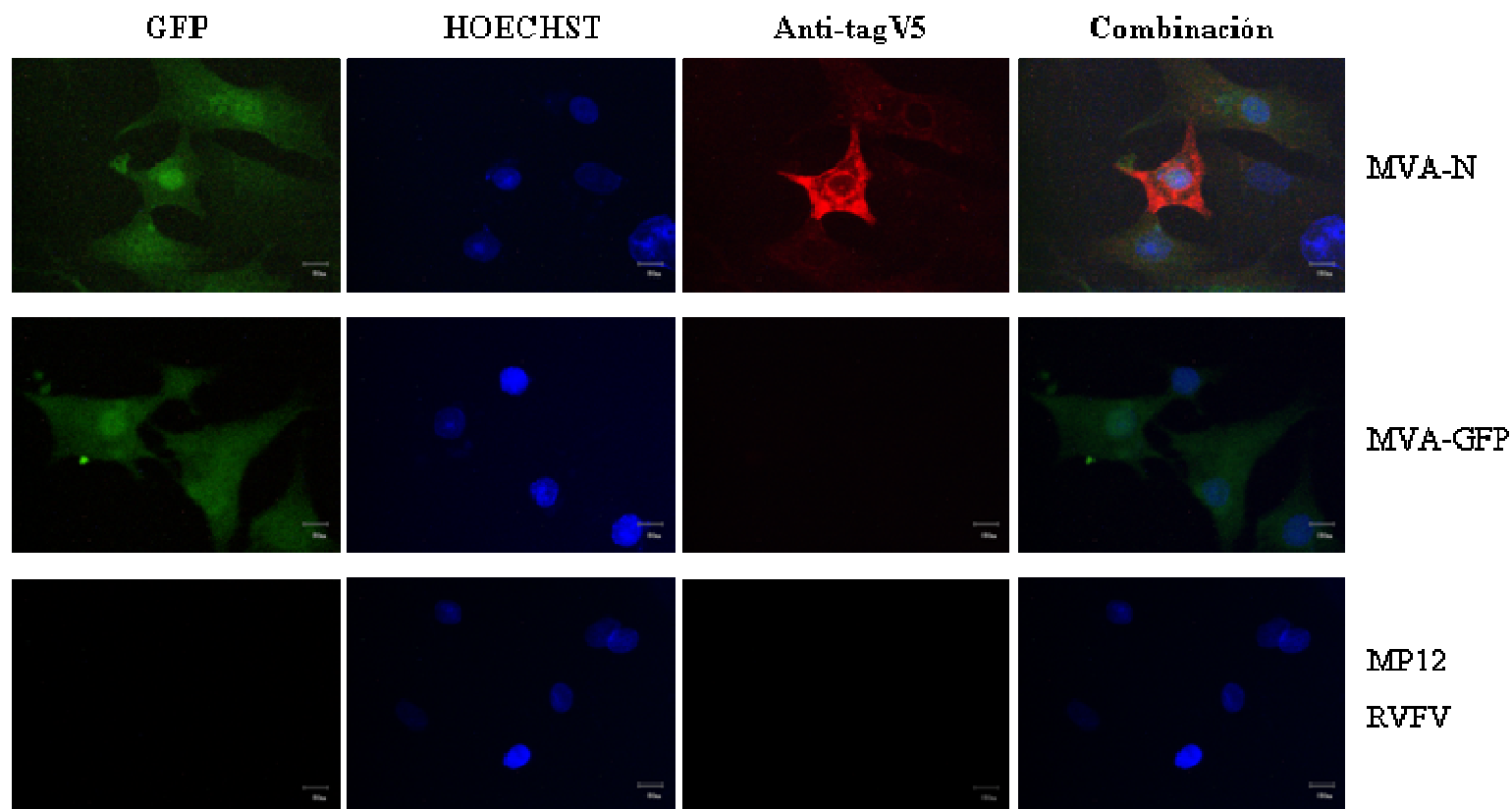
Además, se realizaron ensayos de IFI sobre células BHK-21 infectadas con los diferentes MVAr empleándose para la detección de la proteína recombinante el AcMo anti-tag V5. Como se puede observar en la Figura 14, todos los MVAr presentaban fluorescencia roja y verde confirmando la expresión del tag V5 unido a la proteína recombinante correspondiente y de la GFP, respectivamente. Además, se detectó que la expresión de la GFP sintetizada bajo el control del promotor VV 11 tardío no coincidía con la expresión de los genes del RVFV expresados bajo el control del promotor VV 7.5 temprano/tardío. Los núcleos celulares se tiñeron con Hoechst, observándose una tinción punteada azul en el citoplasma celular que se correspondía con las factorías virales del MVA (Fig. 13).



**Figura 13.** Tinción con Hoechst sobre células BHK-21 infectadas con MVA-Gc. Las flechas indican tinción del ADN presente en el citoplasma celular.







**Figura 14.** IFI sobre células BHK-21 infectadas con diferentes MVAr. La fluorescencia verde indica expresión de GFP, la tinción con Hoechst identifica en azul el ADN y la fluorescencia roja señala la expresión del tag V5 reconocido por el AcMo anti-tagV5.

## **2 CARACTERIZACIÓN DE LA INFECCIÓN DE DOS AISLADOS VIRULENTOS DE RVFV Y DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL EN RATONES.**

Con el objetivo de estudiar la protección inducida por vacunas basadas en ADN y /o MVA frente a RVFV en ratones BALB/c, fue necesario seleccionar una cepa viral y estimar la dosis letal de la misma en este modelo de infección animal. Para ello se utilizaron los aislados de origen sudafricano RVFV 56/74 procedente de bovino, y RVFV AR 20368 aislado de mosquito.

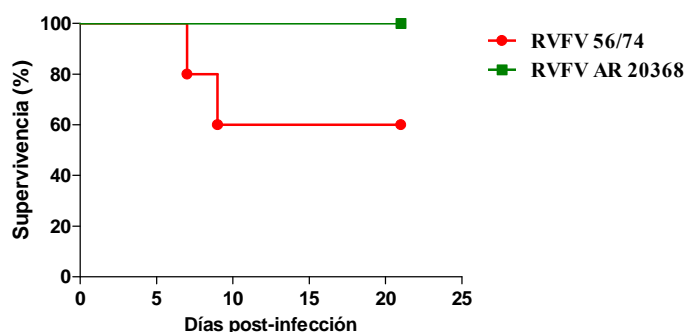
### **➤ Caracterización de dos aislados virulentos de RVFV.**

En primer lugar, se analizó la patogenicidad de los aislados virulentos RVFV 56/74 y RVFV AR 20368 en ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de edad. Para ello se formaron dos grupos de siete animales cada uno, de los cuales únicamente cinco de ellos se inocularon y los otros dos se mantuvieron con ellos como centinelas. La dosis administrada a cada animal fue de  $5 \times 10^3$  pfu por vía IP.

Tras el desafío los animales se monitorizaron diariamente durante 21 días. A partir del 5 dpi se observaron signos clínicos como pelo erizado, secreción ocular, hipotermia, joroba y debilidad en los animales infectados con el aislado RVFV 56/74, y a partir del 7 dpi algunos de ellos desarrollaron alteraciones de origen neurológico como movimientos no coordinados y parálisis del tercio posterior.

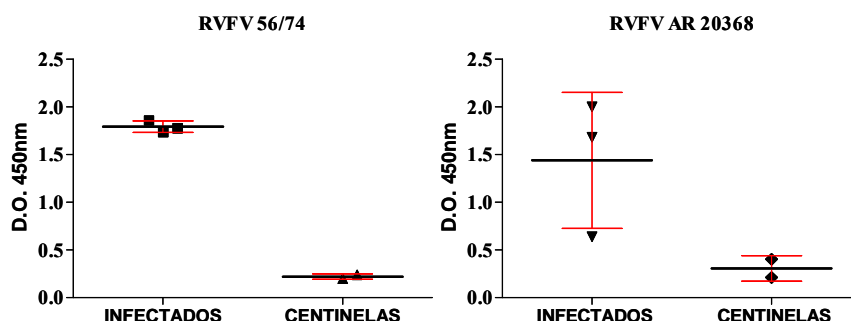
Sin embargo, solo dos de los cinco animales inoculados con RVFV AR 20368 presentaron signos clínicos leves y de menor duración a 5 y 11 dpi. Por último, los animales centinelas de ambos grupos no mostraron signos clínicos de infección durante el experimento.

El porcentaje de supervivencia de los animales inoculados con la cepa RVFV 56/74 fue del 60% con muerte de dos animales a 7 y 9 dpi, mientras todos los animales inoculados con la cepa RVFV AR 20368 sobrevivieron a la infección, no existiendo diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia (Fig. 15).



**Figura 15.** Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con los aislados de RVFV 56/74 y AR 20368.

La presencia de Ac frente a RVFV en los sueros de los animales supervivientes tras el desafío con ambas cepas virulentas se estudió mediante ensayos de neutralización y ensayos de ELISA de captura. Como control negativo de los ensayos se utilizó un suero de ratón BALB/c no infectado. Los resultados obtenidos en ambos ensayos confirmaron que los animales inoculados con ambas cepas presentaban Ac específicos frente al virus, a excepción de un ratón inoculado con RVFV AR 20368 en ausencia de signos clínicos (Fig. 16). Por otra parte, no se detectaron Ac frente al virus en los sueros de los animales centinelas de ambos grupos por lo que no se pudo demostrar una transmisión horizontal capaz de producir una infección.



**Figura 16.** Detección de Ac mediante ELISA de captura en sueros de animales inoculados con ambas cepas, a una dilución 1/80. Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  desviación standard (DS).

Con los datos obtenidos en este experimento, se decidió emplear la cepa de RVFV 56/74 de origen bovino como virus prototipo para los estudios de eficacia de las vacunas generadas en este trabajo.

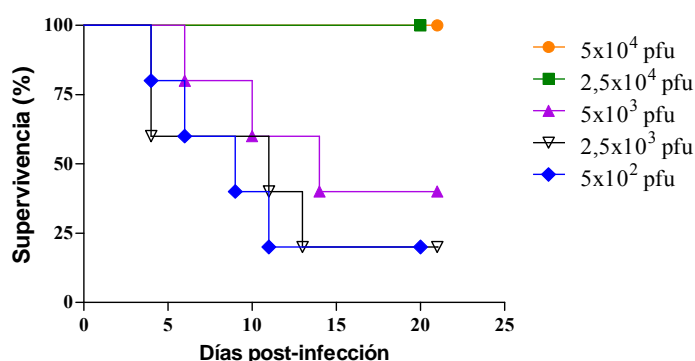
➤ **Determinación de la dosis letal del aislado virulento seleccionado.**

Para el establecimiento de la dosis letal de la cepa RVFV 56/74 se formaron cinco grupos con cinco animales cada uno, y cada grupo fue inoculado con:  $5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  pfu/animal por vía IP.

En este experimento los signos clínicos observados y la cinética de aparición de éstos fueron similares a los obtenidos previamente. Sorprendentemente, se observó en los grupos inoculados con las dosis más bajas de virus  $5 \times 10^3$ ,  $2,5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  pfu/animal una mayor morbilidad y mortalidad con signos clínicos más graves, de inicio más temprano y más persistentes (Tabla 10). Mientras que solo el 50% de los animales inoculados con la dosis más alta ( $5 \times 10^4$  pfu/animal) presentaron signos clínicos, sobreviviendo todos ellos a la infección. El porcentaje de supervivencia fue del 100% en aquellos animales inoculados con las dosis mayores ( $5 \times 10^4$  y  $2,5 \times 10^4$  pfu/animal), disminuyendo la supervivencia al 20% en los inoculados con dosis menores ( $2,5 \times 10^3$  y  $5 \times 10^2$  pfu/animal), con diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia con  $p < 0,05$  (Fig. 17).

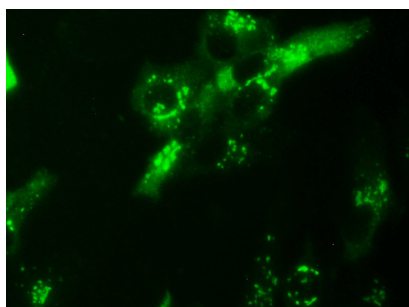
**Tabla 10.** Morbilidad de los animales inoculados con diferentes dosis de RVFV 56/74.

<b>Dosis RVFV 56/74</b>	<b>Morbilidad</b>
$5 \times 10^4$ pfu	2/4
$2,5 \times 10^4$ pfu	4/5
$5 \times 10^3$ pfu	5/5
$2,5 \times 10^3$ pfu	5/5
$5 \times 10^2$ pfu	5/5

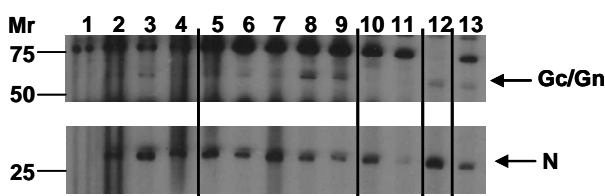


**Figura 17.** Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con diferentes dosis de RVFV 56/74.

Se detectaron Ac específicos frente a RVFV en todos los sueros de animales supervivientes mediante IFI (Fig. 18) y WB (Fig. 19), a excepción de un animal del grupo inoculado con  $5 \times 10^4$  pfu, confirmando que los animales fueron infectados por RVFV al desarrollarse Ac específicos frente al mismo.



**Figura 18.** IFI en células Vero infectadas con MP12 RVFV, utilizando como Ac primario un suero de ratón inoculado con la cepa RVFV 56/74.



**Figura 19.** WB realizado con sueros de ratones inoculados con RVFV 56/74 para la detección de proteínas del virus MP12 RVFV. La dilución empleada fue 1/300. Grupo inoculado con  $5 \times 10^4$  pfu (1-4),  $2,5 \times 10^4$  pfu (5-9),  $5 \times 10^3$  pfu (10-11),  $2,5 \times 10^3$  pfu (12) y  $5 \times 10^2$  pfu (13).

Se decidió emplear la dosis  $10^3$  pfu/animal de la cepa RVFV 56/74 para el desafío de los animales inmunizados ya que reproduce los signos clínicos de la enfermedad, y a su vez causa una morbilidad del 100% y una mortalidad mayor del 75% a lo largo de un tiempo determinado (1 semana). Estos resultados fueron similares a los datos existentes en cuanto a mortalidad y morbilidad obtenidas con otras cepas virulentas de RVFV empleadas en el desafío de ratones BALB/c, lo que nos permitiría comparar en un futuro el grado de protección obtenido tras la inmunización de los animales (Spik, Shurtleff et al. 2006; Wallace, Ellis et al. 2006; Lagerqvist, Naslund et al. 2009).

### **3 ESTUDIO DE LA RESPUESTA INMUNE Y DE LA PROTECCIÓN INDUCIDA POR VACUNAS ADN/MVA FRENTE A RVFV EN RATONES.**

En los experimentos descritos a continuación se estudia la respuesta inmunitaria humoral y celular, así como las citoquinas inducidas tras la vacunación en el modelo murino. Una vez analizados los datos de protección y respuesta inmune, se seleccionó la estrategia vacunal más efectiva para su posterior ensayo en la especie ovina, una de las dianas naturales de RVFV.

#### **3.1 Análisis de la respuesta inmune y de la protección inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c.**

##### **3.1.1 Diseño experimental.**

En estos ensayos se emplearon ratones BALB/c, hembras de 6-8 semanas de edad en grupos de 5-7 ratones, inmunizados con diferentes estrategias de vacunación basados en vacunas ADN y/o MVA expresando las glicoproteínas Gn y Gc y la nucleoproteína N de RVFV, como se muestra en la Tabla 11. Por una parte, los animales recibieron una vacunación homóloga con dos dosis de vacunas ADN para los grupos pCMV-M4 (2X) y pCMV-N (2X), así como dos dosis de MVA en el grupo MVA-N (2X), con un intervalo de 15 días entre cada una. Por otra parte, se empleó una vacunación heteróloga con un primado de ADN más un recuerdo a los 15 días con MVA en los grupos pCMV-M4 + MVA-GnGc, y pCMV-N + MVA-N.

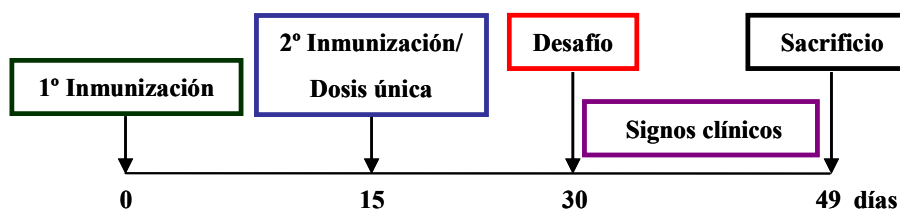
Y por último, los grupos MVA-GnGc (1X), MVA-N (1X) y MVA-GnGc + MVA-N recibieron una sola dosis de MVA o una combinación de ambas, respectivamente. Como controles negativos del experimento se inmunizaron animales con el plásmido pCMV o el vector MVA-GFP en las mismas condiciones.

Los ratones inmunizados con ADN recibieron 100µg por dosis vía IM en ambas patas traseras y los animales vacunados con MVA se inocularon vía IP con  $10^7$  pfu por dosis.

**Tabla 11.** Ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA recombinantes.

Grupo	1° dosis	2° dosis/Dosis única
pCMV-M4 (2X)	pCMV-M4	pCMV-M4
pCMV-M4 + MVA-GnGc	pCMV-M4	MVA-GnGc
MVA-GnGc (1X)		MVA-GnGc
pCMV-N (2X)	pCMV-N	pCMV-N
pCMV-N + MVA-N	pCMV-N	MVA-N
MVA-N (1X)		MVA-N
MVA-N (2X)	MVA-N	MVA-N
MVA-GnGc + MVA-N		MVA-GnGc + MVA-N
pCMV control	pCMV	pCMV
MVA control		MVA-GFP
No inmunizado		

Todos los animales fueron desafiados 15 días después de la última inmunización con  $10^3$  pfu/animal del aislado RVFV 56/74, y monitorizados diariamente hasta el 19 dpi (Fig. 20).



**Figura 20.** Esquema del diseño experimental de eficacia vacunal en ratones BALB/c.

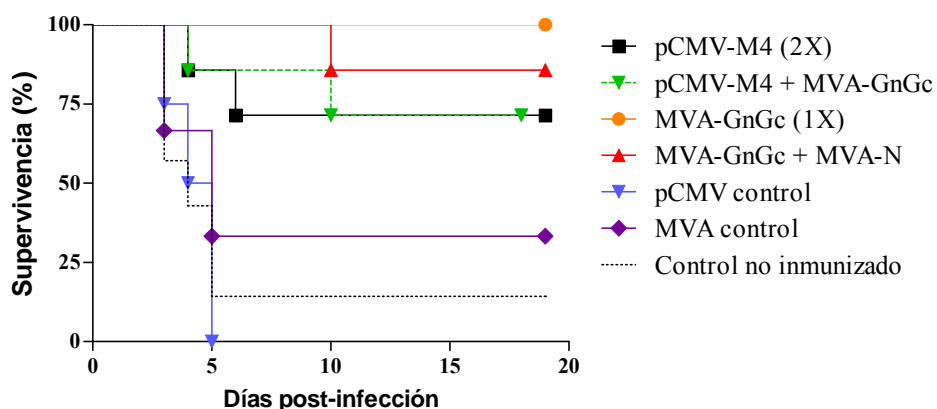


### 3.1.2 Estudio de la protección frente a RVFV en ratones BALB/c mediante vacunas ADN/MVA.

Las diferentes estrategias de vacunación basadas en la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV fueron capaces de inducir mayor grado de protección tras el desafío. Se observó una morbilidad del 72% en el grupo de animales inmunizados con dos dosis de pCMV-M4 con cinco ratones con signos clínicos a lo largo del experimento, donde dos murieron a 4 y 6 dpi, y otros dos presentaron signos clínicos hasta el final del experimento (Tabla 12). Esta morbilidad se redujo hasta el 29% en el grupo de animales que recibieron un primado con pCMV-M4 seguido de un recuerdo con MVA-GnGc, donde solo dos ratones mostraron signos clínicos muriendo a 4 y 10 dpi. A su vez, todos los animales inmunizados con una dosis de MVA-GnGc fueron protegidos tras el desafío en ausencia de signos clínicos, siendo éste el único grupo donde se lograba una supervivencia del 100%, con resultados similares en el grupo que recibió una dosis conjunta de MVA-GnGc + MVA-N donde solo se detectó un animal enfermo que moría a 10 dpi (Fig. 21).

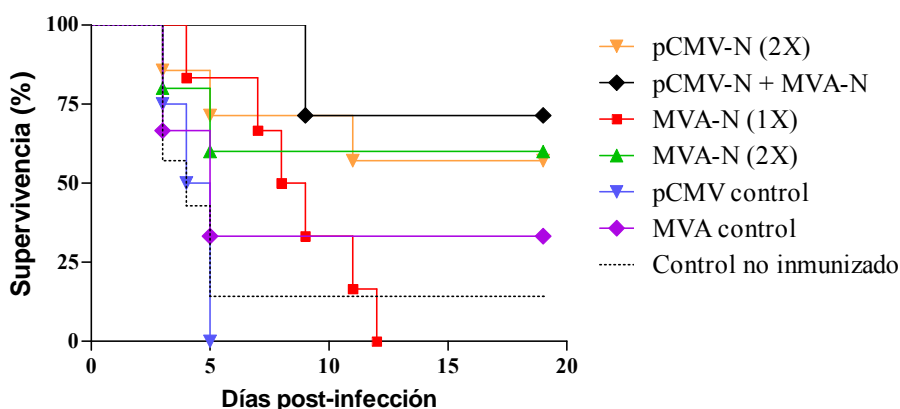
**Tabla 12.** Morbilidad y mortalidad de ratones BALB/c inmunizados con ADN/MVA.

Grupo	Morbilidad	Mortalidad
pCMV-M4 (2X)	5/7	2/7
pCMV-M4 + MVA-GnGc	2/7	2/7
MVA-GnGc (1X)	0/7	0/7
MVA-GnGc + MVA-N	1/7	1/7
pCMV-N (2X)	3/7	3/7
pCMV-N + MVA-N	6/7	2/7
MVA-N (1X)	6/6	6/6
MVA-N (2X)	5/5	2/5
pCMV control	4/4	4/4
MVA control	6/6	4/6
Control no inmunizado	7/7	6/7



**Figura 21.** Datos de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA expresando las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV.

Por otra parte, los animales inmunizados con vacunas expresando la nucleoproteína N de RVFV se protegieron parcialmente tras el desafío (Fig. 22). El grupo inmunizado con dos dosis de pCMV-N presentó una morbilidad del 43% con tres animales con signos clínicos graves, muriendo estos a 3, 5 y 11 dpi. En contra de lo esperado, se incrementó la morbilidad hasta el 86% con el empleo de la vacunación heteróloga pCMV-N + MVA-N detectándose signos clínicos en seis animales, con muerte de dos ratones a 9 dpi y permanencia de signos clínicos hasta el final del experimento en el resto. Por último, se observó en el grupo inmunizado con una dosis de MVA-N una morbilidad del 100% y un retraso en la aparición de los signos con respecto al grupo control, con muerte de todos los ratones a 13 dpi. El empleo de dos dosis de MVA-N mejoró los datos observados con una dosis, aumentando hasta el 60% la supervivencia de los animales pero con presencia de signos clínicos en todos ellos.



**Figura 22.** Datos de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA expresando la nucleoproteína N de RVFV.

### 3.1.3 Detección de virus en sangre tras el desafío viral con RVFV en ratones BALB/c inmunizados.

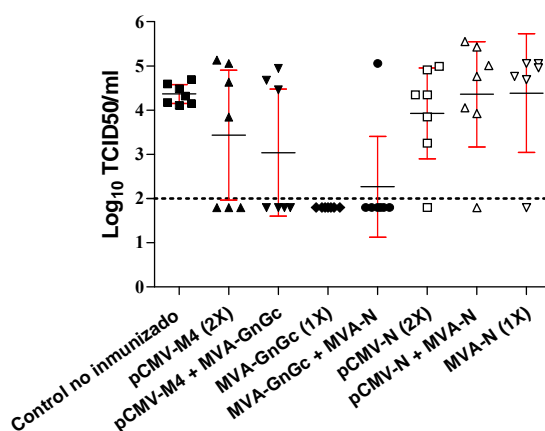
Se analizaron los niveles de viremia en sangre tras el desafío con el fin de conocer la esterilidad inducida por las diferentes estrategias vacunales.

Todos los animales controles pertenecientes al grupo no inmunizado mostraron a 3 dpi títulos virales en sangre de al menos  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml, confirmando la presencia de altos niveles de virus infeccioso en todos ellos (Fig. 23). La inmunización con dos dosis de pCMV-M4 disminuyó a cuatro los animales con viremia relacionándose con una menor presencia de signos clínicos en este grupo, junto a tres animales sin viremia a lo largo del experimento. Estos valores fueron mejorados mediante la estrategia vacunal heteróloga pCMV-M4 + MVA-GnGc, reduciéndose a tres los animales virémicos y aumentando a cuatro los animales negativos coincidiendo con la ausencia de signos clínicos en éstos. Asimismo, no se logró aislar virus infeccioso en ninguno de los animales vacunados con una dosis de MVA-GnGc correspondiéndose con la alta protección obtenida en este grupo, y donde solo un animal del grupo inmunizado con MVA-GnGc + MVA-N presentó viremia desarrollando signos clínicos con muerte tras el desafío.

En cuanto a los animales inmunizados con vacunas que expresaban la nucleoproteína N, tanto en vacunación homóloga como heteróloga, mostraron títulos

virales en sangre más elevados con respecto a aquellos que recibieron vacunas expresando las glicoproteínas Gn y Gc. En este caso, solo un animal en cada grupo inmunizado con la nucleoproteína N no mostraba viremia a 3 dpi coincidiendo con la ausencia de signos clínicos a este tiempo.

En las muestras de sangre recogidas a 6 dpi solo se detectó viremia en un animal del grupo pCMV-M4 (2X) con un título de  $10^{3.5}$  TCID<sub>50</sub>/ml, así como en un animal del grupo MVA-N (1X) con  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml, muriendo a 6 y 8 dpi respectivamente. El resto de animales, incluidos los controles no inmunizados, no mostraron viremia a 6, 10 y 13 dpi lo que indicaba la eliminación de virus en sangre.



**Figura 23.** Aislamiento viral en sangre de los diferentes grupos inmunizados con vacunas ADN/MVA a 3 dpi. Los datos se muestran como media  $\pm$  intervalo de confianza al 95%. El límite de detección del ensayo se estableció en  $10^2$  TCID<sub>50</sub>/ml (línea punteada).

Se analizó la presencia en sangre de ARN viral perteneciente al segmento S de RVFV a 3 dpi mediante ensayos de RT-qPCR. Los animales no inmunizados mostraron valores menores de Ct que variaban de 13 a 27, indicativos de mayores cantidades de ARN viral en sangre que coincidía con los títulos elevados de viremia mostrados anteriormente. Como excepción, un animal no inmunizado mostró un Ct de 33, coincidiendo con el animal que sobrevivió al desafío a pesar de presentar signos clínicos.

Durante el experimento, los animales inmunizados con vacunas expresando las glicoproteínas Gn y Gc presentaron mayoritariamente valores de Ct cercanos a 30 correspondiéndose con una mayor protección frente al desafío junto a niveles de viremia inferiores. Así, los grupos MVA-GnGc (1X) y MVA-GnGc + MVA-N mostraron niveles de Ct superiores en consonancia con la ausencia de signos clínicos y de viremia en ambos grupos, a excepción de un animal que presentó un Ct de 23. Mientras que los niveles de ARN viral fueron elevados en aquellos animales inmunizados con la nucleoproteína N, coincidiendo con la mayor presencia de signos clínicos tras el desafío (Tabla 13). Durante el experimento fueron detectados valores de Ct bajos en el grupo MVA-N (1X) similares a los del grupo control, lo que sugería que la vacuna no había protegido frente al desafío.

Con los datos obtenidos en su conjunto, se concluyó que se pudo detectar ARN viral en mayor o menor medida tras el desafío, pero no virus infeccioso en todas las muestras de sangre tras el desafío.

**Tabla 13.** Detección de ARN viral en sangre a 3 dpi por RT-qPCR. Se muestran las Ct de forma individualizada para los diferentes grupos inmunizados con vacunas ADN/MVA.

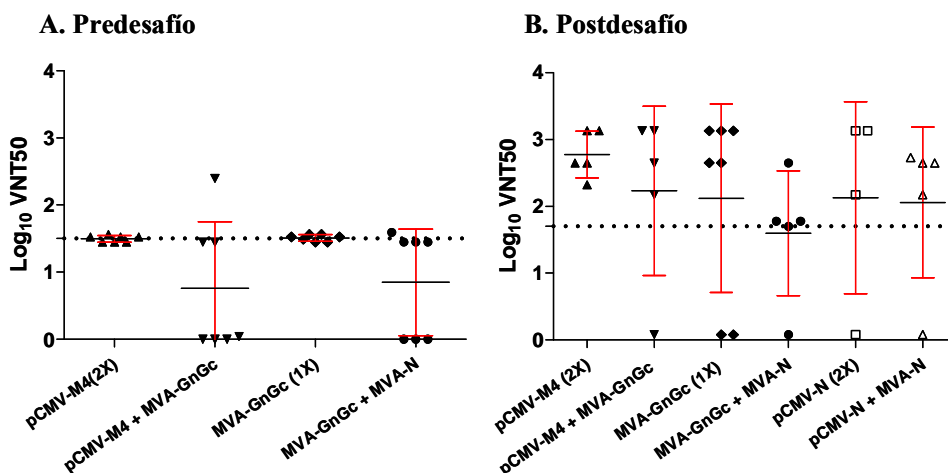
Ct/Nº animal	1	2	3	4	5	6	7
<b>Control no inmunizado</b>	14,48	19,10	33,34	27,68	21,97	26,61	13,10
<b>pCMV-M4 (2X)</b>	31,18	24,23	21,98	37,48	16,39	19,39	22,52
<b>pCMV-M4 + MVA-GnGc</b>	36,87	30,96	24,42	31,06	13,34	27,82	34,15
<b>MVA-GnGc (1X)</b>	35,51	32,31	35,41	28,83	28,66	34,11	29,78
<b>MVA-GnGc + MVA-N</b>	34,69	36,04	38,63	34,35	26,55	23,26	34,42
<b>pCMV-N (2X)</b>	28,11	27,04	31,62	26,32	14,14	31,54	30,01
<b>pCMV-N + MVA-N</b>	23,14	36,42	30,88	20,02	23,73	35,43	24,86
<b>MVA-N (1X)</b>	26,63	26,26	26,81	21,32	32,88	25,09	

### **3.1.4 Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c.**

Se analizó la presencia y niveles de Ac en suero frente a RVFV inducidos tras la vacunación mediante ensayo de neutralización viral, ELISA de captura, WB e IFI.

Se detectaron niveles moderados de Ac neutralizantes con un título de  $VNT_{50}$  de  $1,5\log_{10}$  en todos los animales del grupo pCMV-M4 (2X) (Fig. 24A). A pesar de ello, cinco de siete animales presentaron signos clínicos tras el desafío donde dos de ellos murieron. Asimismo, se detectó en todos los animales inmunizados con una dosis de MVA-GnGc el mismo título de Ac neutralizantes que el grupo pCMV-M4 (2X), pero ninguno de estos animales mostró signos clínicos tras la infección. Mientras que en el grupo MVA-GnGc + MVA-N solo cuatro de siete animales presentaron títulos de neutralización de  $1,5\log_{10}$ , con muerte de uno de ellos tras el desafío. Por otra parte, un único animal del grupo pCMV-M4 + MVA-GnGc mostró alta capacidad de neutralización con un título de  $2,4\log_{10}$ , dos animales presentaron un título de  $1,5\log_{10}$  no sobreviviendo éstos al desafío, y en el resto de animales no se detectaron Ac neutralizantes coincidiendo con la ausencia de signos clínicos. Se estableció en  $1,5\log_{10}$  el límite de detección del ensayo de neutralización, siendo los valores inferiores a este límite considerados como negativos.

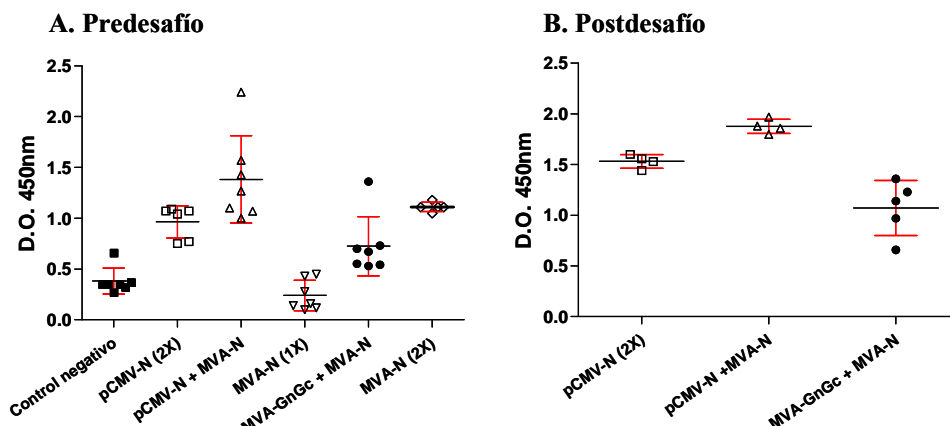
Tras el desafío, los animales supervivientes presentaron títulos de neutralización superiores en todos los grupos sin existir diferencias entre los inmunizados con vectores codificando la nucleoproteína N o las glicoproteínas Gn y Gc (Fig. 24B). Sin embargo, uno o dos animales de cada grupo no incrementó su título de Ac neutralizantes coincidiendo con aquellos que no presentaron signos clínicos de enfermedad durante el experimento. Ello puede indicar que estos animales fueron capaces de eliminar el virus y/o limitar la replicación viral, no realizándose la posterior inducción de Ac neutralizantes.



**Figura 24.** Título de Ac neutralizantes en sueros de animales inmunizados con ADN/MVA predesafío (A) y postdesafío (B). Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  DS. El límite de detección del ensayo se estableció en  $1,5\log_{10}$  y en  $1,7\log_{10}$ , respectivamente (línea punteada).

Se analizaron los niveles de Ac (IgG totales) específicos frente a la N mediante ELISA (Fig. 25A), donde los resultados obtenidos mostraron un aumento significativo de Ac en los sueros de aquellos animales inmunizados con la vacunación heteróloga pCMV-N + MVA-N con respecto a pCMV-N (2X). Sin embargo, ni se detectaron Ac anti-N tras la inmunización con una dosis de MVA-N ni tras la dosis conjunta de MVA-GnGc + MVA-N, sugiriendo que estas estrategias de inmunización no eran capaces de desarrollar una potente respuesta de tipo humoral en el animal. Estos niveles de Ac aumentaron de forma significativa con el empleo de dos dosis de MVA-N, con valores similares al grupo pCMV-N (2X).

Después del desafío, los grupos que recibieron tanto la vacuna homóloga pCMV-N como la vacuna heteróloga pCMV-N + MVA-N incrementaron sus niveles de Ac (Fig. 25B). Sin embargo, los niveles de Ac fueron más bajos en los animales vacunados con MVA-GnGc + MVA-N, lo que podría indicar una menor replicación del virus en estos animales coincidiendo con la ausencia de signos clínicos y viremia tras el desafío.

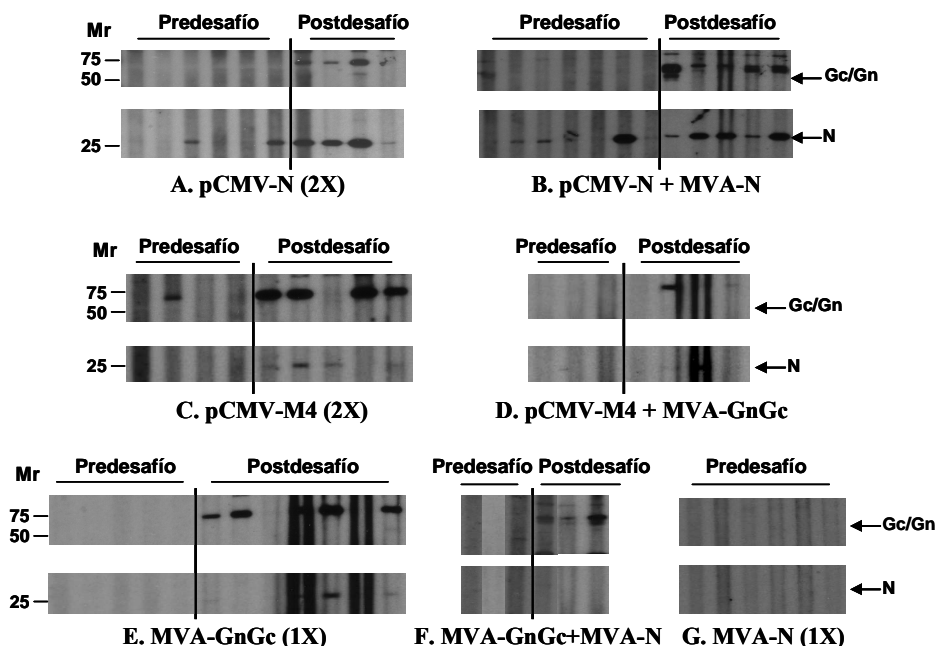


**Figura 25.** Detección de Ac mediante ELISA de captura en sueros de ratones vacunados con ADN/MVA predesafío (A) y postdesafío (B), a una dilución 1/80. Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  DS.

Se detectaron Ac específicos frente a las proteínas del virus MP12 RVFV mediante ensayos de WB. Los sueros de animales inmunizados con pCMV-N (2X), pCMV-N + MVA-N, y sueros postdesafío reconocían una proteína con un tamaño de 27 kDa que se correspondía con el de la nucleoproteína N viral. Esto confirmaba la elevada inmunogenicidad de esta proteína y la presencia de epítomos lineales en ella, así como la alta respuesta humoral obtenida con estas estrategias vacunales. Sin embargo, ninguno de los sueros de los animales inmunizados con MVA-N (1X) y MVA-GnGc + MVA-N reconocían la nucleoproteína N viral, como ya se había observado previamente con otras técnicas (Fig. 26).

Asimismo, solo se logró detectar Ac frente a la glicoproteína Gn (54 kDa) y Gc (59 kDa) en algunos sueros de animales postdesafío, por lo que el reconocimiento de esta proteína en condiciones desnaturalizantes no fue observado tras la inmunización.

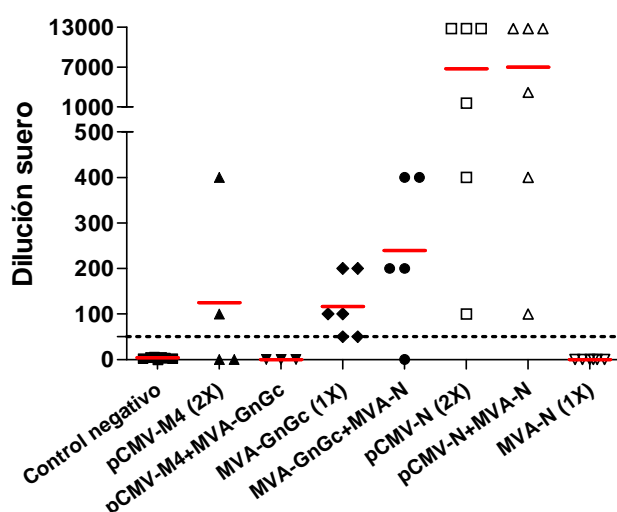




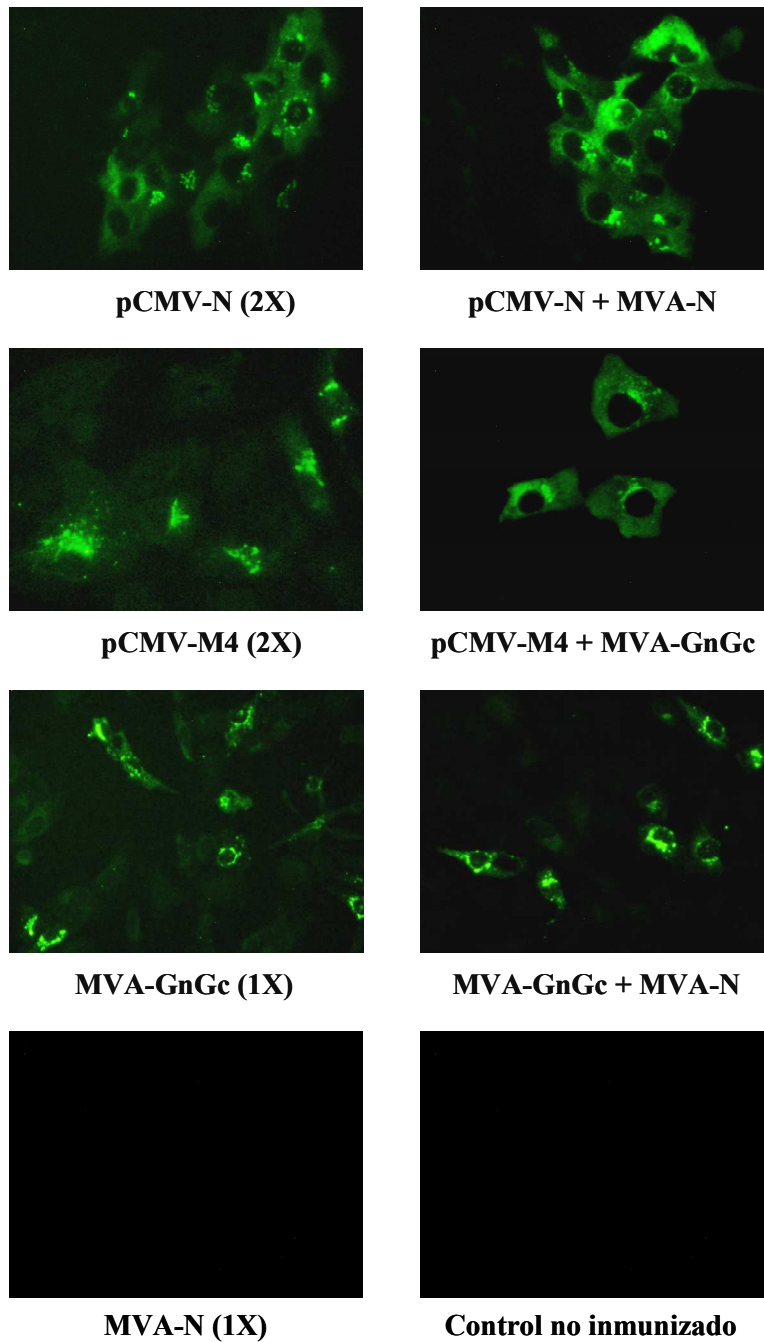
**Figura 26.** Detección de Ac frente a las proteínas del virus MP12 RVFV por WB. Los sueros de los ratones inmunizados con ADN/MVA predesafío y postdesafío fueron empleados a una dilución 1/300.

Por último, se identificaron Ac específicos frente a la nucleoproteína N tanto en los sueros de animales inmunizados con la vacunación homóloga pCMV-N (2X) como con la vacunación heteróloga pCMV-N + MVA-N mediante IFI, donde las células presentaban una marcaje característico con el citoplasma teñido de verde con títulos que estaban entre 1/100 y más de 1/12000 (Fig. 27). Sin embargo, con los sueros de animales vacunados con pCMV-M4 (2X) y pCMV-M4 + MVA-GnGc las células presentaban un marcaje perinuclear tiñéndose intensamente el retículo indicando la presencia de glicoproteínas en esta zona, con títulos que oscilaron entre 1/50 y 1/350 (Fig. 28). Los títulos de IFI alcanzados por las vacunas que codificaban la nucleoproteína N fueron muy superiores a los logrados por las vacunas que codificaban las glicoproteínas virales donde no se detectaron Ac en algunos de los sueros de estos animales, que indica por un lado la gran capacidad inmunogénica de la nucleoproteína N y por otro, la funcionalidad de estas estrategias vacunales para inducir una respuesta mediada por Ac.

Por otra parte, los sueros de los animales inmunizados con MVA-GnGc, y MVA-GnGc + MVA-N presentaron títulos bajos (entre 1/50 y 1/200), que podría ser debido a la baja respuesta de tipo humoral inducida mediante el vector MVA. Mientras aquellos sueros de animales inmunizados con una dosis de MVA-N fueron negativos por IFI, al igual que los sueros de los controles no inmunizados, confirmando la falta de inducción de Ac mediante el empleo de esta vacuna a pesar de expresar la proteína más inmunogénica del virus.



**Figura 27.** Título de Ac anti-RVSV detectados por IFI en sueros de ratones inmunizados con vacunas ADN/MVA. El límite de detección del ensayo se estableció en una dilución 1/50 (línea punteada). Los datos de cada grupo están representados como media.



**Figura 28.** IFI sobre células Vero infectadas con MP12 RVFV con sueros de animales inmunizados con diferentes estrategias ADN/MVA predesafío.

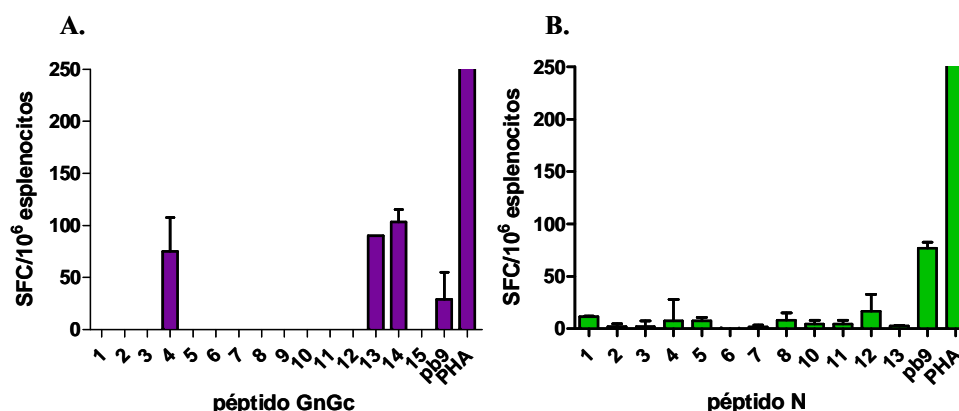
### **3.1.5 Estudio de la respuesta inmune celular inducida por vacunas ADN/MVA en ratones BALB/c.**

#### **► Análisis de estimulación celular específica en presencia de péptidos de N y GnGc de RVFV mediante detección de IFN- $\gamma$ por ELISPOT.**

Para ello, se inmunizaron dos ratones BALB/c con una dosis de  $10^7$  pfu de la vacuna MVA-GnGc, y otros dos con MVA-N por vía IP. A los 7 días post-inmunización, se obtuvieron los esplenocitos y se estimularon en presencia de los péptidos de forma individual.

Los esplenocitos de los ratones inmunizados con una dosis de MVA-GnGc secretaron IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 de las glicoproteínas Gn y Gc. El péptido 4 (SYAHHRTLL), con haplotipo teórico K<sup>d</sup>, se localizó en la glicoproteína Gn en la posición 205-213. Este péptido había sido descrito previamente como epítipo CTL potencial (Bhardwaj, Heise et al. 2010). Los otros dos péptidos identificados estaban localizados en la glicoproteína Gc: el péptido 13 (SYKPMIDQL), con haplotipo teórico K<sup>d</sup> en la posición 955-963 mientras que el péptido 14 (GGPLKTILL) de haplotipo teórico D<sup>d</sup> en la posición 1154-1162. El resto de péptidos seleccionados basados en la secuencia de GnGc no fueron capaces de inducir secreción de IFN- $\gamma$  en las condiciones del ensayo (Fig. 29A).

Por otra parte, ninguno de los esplenocitos de los animales inmunizados con MVA-N secretaron IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos específicos de la nucleoproteína N. Sin embargo, estos animales si respondieron frente a la estimulación con el péptido control pb9, incluso con valores superiores a los animales inmunizados con MVA-GnGc (Fig. 29B), lo que sugiere que el antígeno fue procesado de forma correcta pero ninguno de los péptidos seleccionados fue capaz de estimular una respuesta inmune celular.



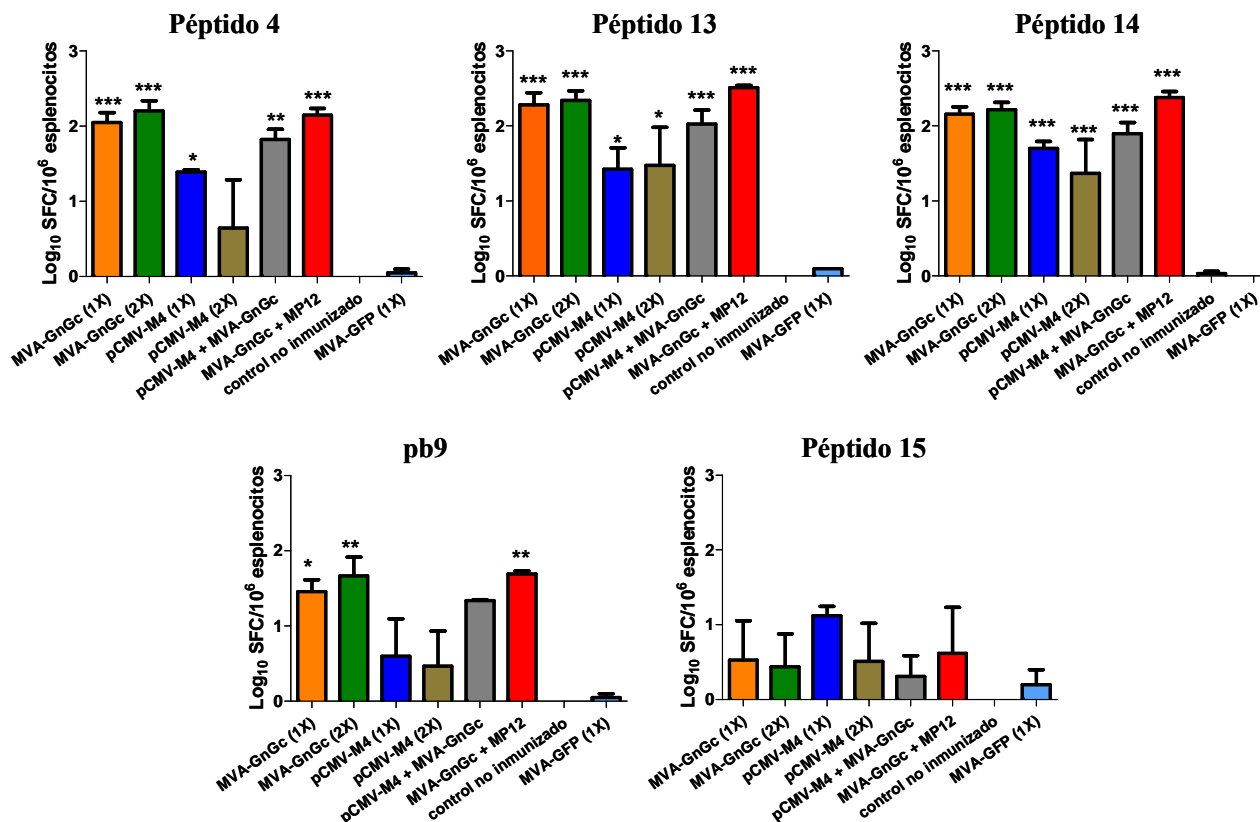
**Figura 29.** Detección de IFN- $\gamma$  mediante ELISPOT con esplenocitos de animales inmunizados con una dosis de MVA-GnGc (A) o una dosis de MVA-N (B). Los valores se muestran como la media  $\pm$  DS de las células formadoras de spots (SFC) de dos animales por cada 10<sup>6</sup> esplenocitos.

A continuación, se estudió la respuesta inmune celular inducida por las diferentes estrategias vacunales basadas en ADN y/o MVA (Tabla 12) en presencia de todos los péptidos a los 7 días post-inmunización mediante ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$ . Se observó que únicamente los péptidos 4, 13 y 14 de GnGc inducían la secreción de IFN- $\gamma$  en mayor o menor medida según la estrategia de inmunización empleada, confirmandose los resultados obtenidos previamente.

Los animales inmunizados con una o dos dosis de MVA-GnGc presentaron una fuerte respuesta inmune de linfocitos T en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 de GnGc, que fue similar a la obtenida en aquellos animales que recibieron un *boost* con la vacuna atenuada MP12 RVFV tras el primado con MVA-GnGc. Por otra parte, los animales inmunizados con una dosis de pCMV-M4 desarrollaron una menor respuesta celular frente a los péptidos 4 y 13 de GnGc, en comparación con los animales vacunados con una dosis de MVA-GnGc. Esta respuesta T se incrementó de forma significativa cuando se realizó un *boost* con MVA-GnGc, pero no con la segunda dosis realizada con la vacuna pCMV-M4. Por último, la secreción de IFN- $\gamma$  en presencia del pb9 en los animales inmunizados con MVA-GnGc fue menor en comparación con los valores obtenidos frente a los péptidos de la GnGc y que aumentaron tras la segunda dosis. Ninguno de los controles negativos (no

inmunizados/inmunizados con MVA-GFP), secretaron IFN- $\gamma$  frente a los péptidos de la GnGc. Como péptido control negativo se utilizó el péptido 15 al no inducir respuesta celular en ningún animal vacunado (Fig. 30).

Al no ser capaces de detectar secreción de IFN- $\gamma$  frente a los diferentes péptidos de la nucleoproteína N en los animales inmunizados con una dosis de MVA-N, se decidió realizar de nuevo ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$  con esplenocitos de animales supervivientes a la infección que habían sido vacunados previamente con diferentes estrategias de ADN y/o MVA codificando la nucleoproteína N. Ninguno de los animales ensayados generó una respuesta inmune de linfocitos T en presencia de los 13 péptidos de la nucleoproteína N utilizados. Por tanto, se concluyó que los péptidos de la nucleoproteína N de RVFV seleccionados no eran capaces de inducir una respuesta celular en ratones BALB/c.



**Figura 30.** ELISPOT IFN- $\gamma$  de los animales inmunizados con vacunas ADN y/o MVA codificando las glicoproteínas Gn y Gc con los péptidos teóricos restringidos a MHC de clase I 4, 13, 14 y 15. El péptido control positivo para los animales inmunizados con MVA fue el pb9. Los spots obtenidos se convirtieron a  $\log_{10}$  con el fin de limitar el rango de variación entre los valores de los individuos, y se muestran como media  $\pm$  DS de tres experimentos independientes. Los asteriscos indican el nivel de significancia de cada grupo cuando es comparado con el grupo control MVA-GFP mediante ANOVA con un test post-hoc de Dunnet (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,001$ ; \*\*\* =  $p < 0,0001$ ).

➤ **Estudio de las células secretoras de IFN- $\gamma$  mediante ensayos de ICCS.**

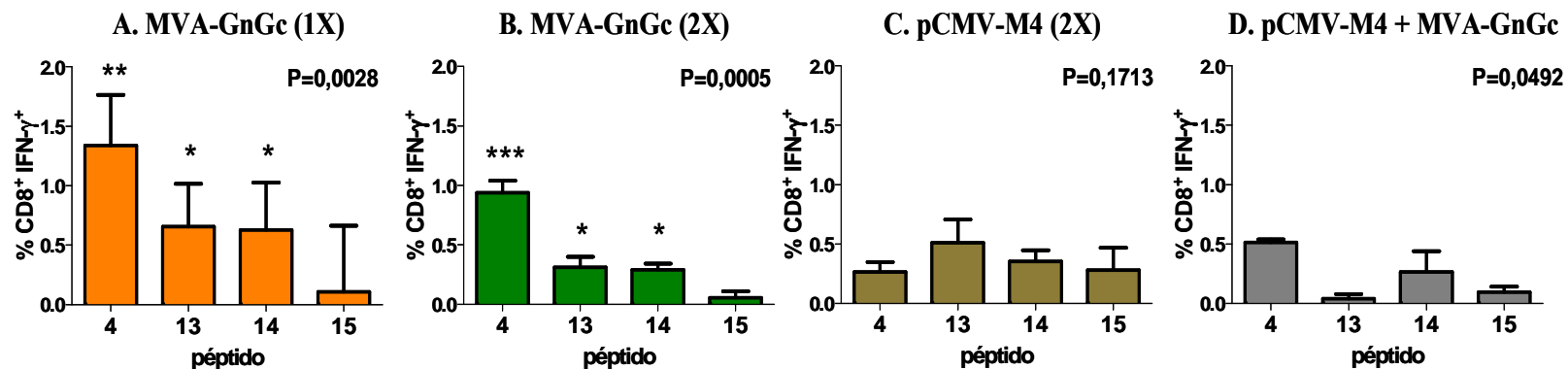
Los animales inmunizados con una o dos dosis de MVA-GnGc presentaron un porcentaje significativo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresaban IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 de GnGc, siendo la respuesta frente al péptido 4 superior con respecto a la obtenida con los péptidos 13 y 14 (Fig. 31).

Por otra parte, los animales inmunizados con una o dos dosis de pCMV-M4 no mostraron porcentajes detectables de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Asimismo, el empleo de un *boost* con MVA-GnGc tras el primado con ADN incrementó el porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en presencia de los péptidos 4 y 14 con valores que no diferían significativamente con respecto al péptido control, siendo éstos muy inferiores a los obtenidos por una o dos dosis de MVA-GnGc.

Por último, los animales que recibieron una dosis de MVA-GnGc seguida de un recuerdo con MP12 no mostraron estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> a pesar de los altos valores obtenidos mediante ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$ .

Los resultados obtenidos para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos seleccionados fueron negativos para todas las estrategias vacunales empleadas, sugiriendo que la secreción de IFN- $\gamma$  en este caso estaba mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.





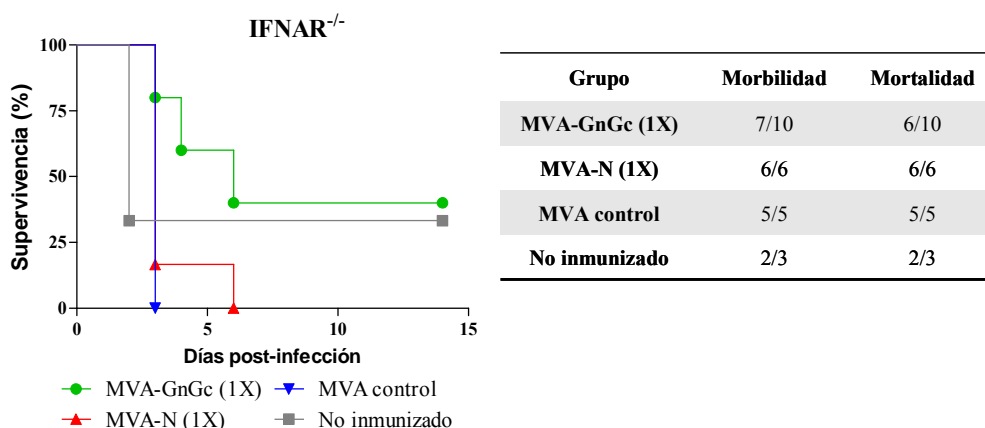
**Figura 31.** Detección de linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en presencia de los péptidos 4, 13, 14 y 15 de GnGc mediante ICCS. Los valores están representados como el % (media  $\pm$  DS de dos animales) restando el valor del medio, de los grupos MVA-GnGc (1X) (A), MVA-GnGc (2X) (B), pCMV-M4 (2X) (C), y pCMV-M4 + MVA-GnGc (D). Los valores de p de *one way* ANOVA indican la variación significativa del grupo ( $p < 0,05$ ), y los asteriscos el nivel de significancia comparada con el péptido control 15 mediante test post-hoc de Tukey (\*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,001$ ; \*\*\*= $p < 0,0001$ ).

### 3.2 Estudio comparativo de la inmunidad y protección inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev *wild type*.

#### 3.2.1 Estudio de la protección inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt.

Se inmunizaron grupos de 5-10 ratones IFNAR<sup>-/-</sup> de 6-8 semanas de edad con una dosis de  $10^7$  pfu de las vacunas MVA<sub>r</sub>. Los grupos de animales fueron: MVA-GnGc, MVA-N y MVA-GFP, y un grupo sin inmunizar. El desafío fue realizado a los 15 días post-inmunización con  $10^4$  pfu por animal de la cepa atenuada MP12 RVFV vía IP, y fueron observados diariamente hasta el 14 dpi.

Se observó una mortalidad del 60% así como una morbilidad del 70% en los animales inmunizados con una dosis de MVA-GnGc tras el desafío. Estos resultados fueron muy inferiores a los descritos en la cepa BALB/c, sugiriendo que la presencia de una respuesta innata funcional mediada por IFN de tipo I era imprescindible para esta protección. Por otra parte, ninguno de los animales inmunizados con una dosis de MVA-N sobrevivió tras el desafío, observándose solo un retraso en la mortalidad con respecto al grupo MVA control (Fig. 32), siendo estos datos similares a los obtenidos en ratones BALB/c.



**Figura 32.** Datos de supervivencia y morbilidad tras el desafío con MP12 RVFV en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> inmunizados con MVA<sub>r</sub>.

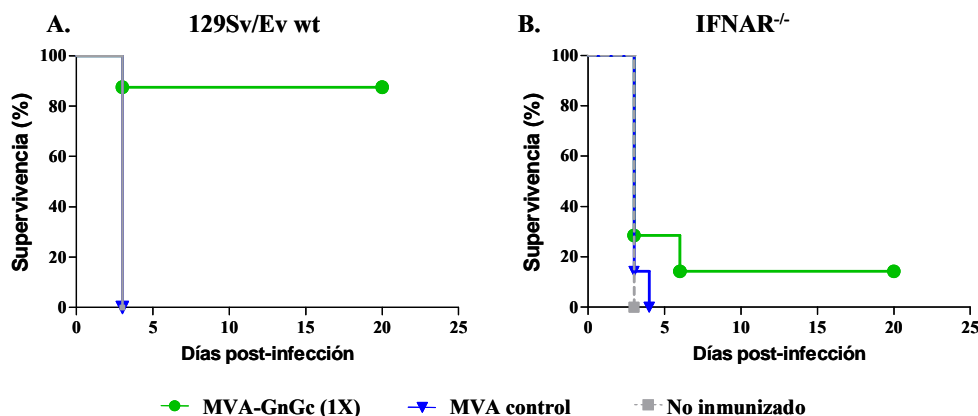
Con el fin de comparar la inmunidad y protección inducida por MVA-GnGc tanto en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> como en la cepa wt con el mismo fondo genético 129Sv/Ev se inmunizaron grupos de 6-7 ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt de 6-8 semanas de edad con una dosis de MVA: MVA-GnGc, MVA-GFP y no inmunizado, incluyendo además dos grupos de ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con una o dos dosis de MVA-N. A los 15 días tras la inmunización fueron desafiados con 10<sup>3</sup> pfu de la cepa virulenta RVFV 56/74, y monitorizados diariamente hasta el 20 dpi.

Tras el desafío todos los ratones IFNAR<sup>-/-</sup> inmunizados con MVA-GnGc presentaron signos clínicos, muriendo cinco animales a 3 dpi y un animal a 6 dpi (Tabla 14), mientras que solo uno de ocho ratones 129Sv/Ev wt del grupo MVA-GnGc presentó signos clínicos y moría a 3 dpi.

**Tabla 14.** Morbilidad observada tras el desafío con RVFV 56/74 en las dos cepas de ratones.

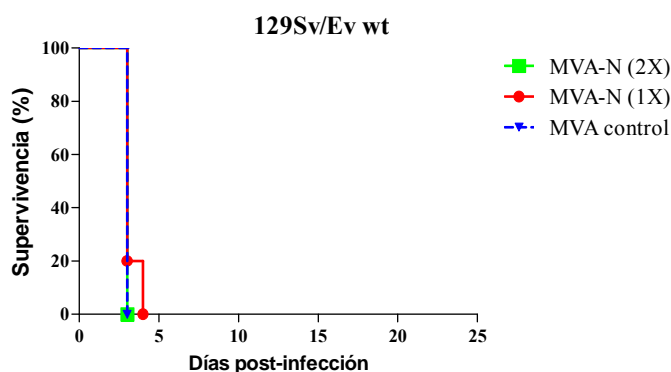
Grupo	129Sv/Ev wt	IFNAR <sup>-/-</sup>
<b>MVA-GnGc (1X)</b>	1/8	7/7
<b>MVA control</b>	7/7	7/7
<b>No inmunizado</b>	6/6	6/6

La supervivencia observada tras el desafío fue del 88% para los ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc, disminuyendo dicha protección al 14% en IFNAR<sup>-/-</sup> con diferencias significativas entre ambas curvas de supervivencia (Fig. 33). Por otra parte, los dos grupos de ratones control (MVA-GFP y sin inmunizar) presentaron signos clínicos y murieron a 3 dpi. Los elevados datos de protección obtenidos con MVA-GnGc fueron confirmados así en dos cepas de ratones (BALB/c y 129Sv/Ev) con diferente fondo genético, concluyendo que las diferencias observadas en la protección inducida por la vacuna MVA-GnGc residía en la funcionalidad del IFN de tipo I, y no en el fondo genético del animal empleado.



**Figura 33.** Datos de supervivencia tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones 129Sv/Ev wt (A) e IFNAR<sup>-/-</sup> (B) inmunizados con MVA-GnGc.

Por último, todos los ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con una o dos dosis de MVA-N mostraron signos clínicos tras el desafío viral con muerte de todos ellos a 3 y 4 dpi, sin existir diferencias significativas entre ambos grupos (Fig. 34). En esta cepa de ratón ni se obtuvo un retraso de la mortalidad con una dosis de MVA-N, ni se indujo cierto grado de protección con el empleo de dos dosis, en comparación con el empleo de estas vacunas en ratones BALB/c.



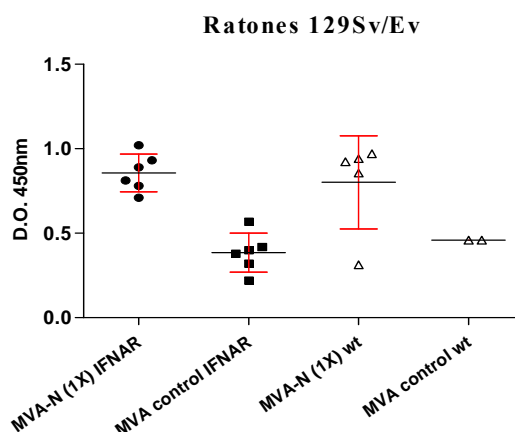
**Figura 34.** Datos de supervivencia tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-N.

### 3.2.2 Estudio de la respuesta inmune inducida por vacunas MVA en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt.

Los sueros de los animales inmunizados con los MVAr en los diferentes experimentos recogidos tanto antes como después del desafío se analizaron mediante ensayos de neutralización viral y ELISA de captura.

No se detectaron Ac neutralizantes en los sueros predesaño de los ratones 129Sv/Ev wt e IFNAR<sup>-/-</sup> inmunizados con una dosis de MVA-GnGc estableciéndose el límite de detección en un VNT<sub>50</sub> de 1,4log<sub>10</sub>. Tras el desafío, todos los animales 129Sv/Ev wt supervivientes mostraron niveles de Ac neutralizantes elevados con una media  $\pm$  DS de VNT<sub>50</sub> de 3log<sub>10</sub>  $\pm$  0,365, y el animal IFNAR<sup>-/-</sup> superviviente presentó un VNT<sub>50</sub> de 3,5log<sub>10</sub>.

Se detectaron niveles moderados de Ac frente a la nucleoproteína N en los sueros predesaño de los ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt inmunizados con una dosis de MVA-N mediante ELISA de captura (Fig. 35), con niveles de Ac más elevados con respecto a sus controles. A pesar de la detección de Ac frente a la nucleoproteína N tras la inmunización, los animales de ambas cepas murieron tras el desafío, lo que indicaba la falta de inducción de una respuesta inmune protectora con MVA-N.



**Figura 35.** ELISA de captura con sueros predesaño de ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt inmunizados con una dosis de MVA-N (dilución 1/100). Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  DS.

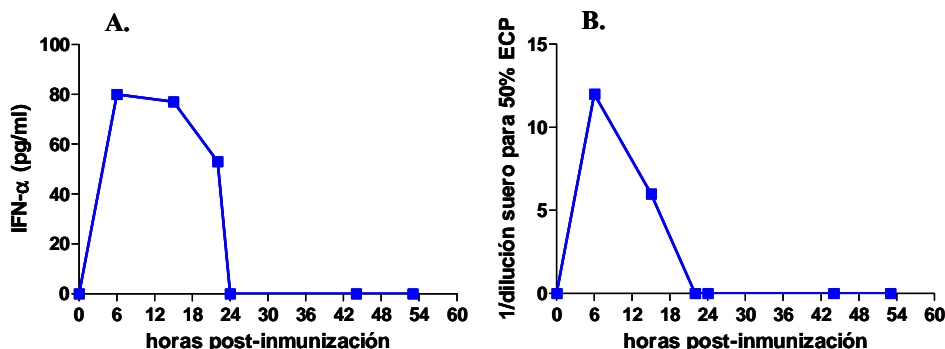
Se realizaron ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$  con las células de los ratones 129Sv/Ev wt MVA-GnGc supervivientes a la infección, de un animal inmunizado con dos dosis de MVA-GnGc así como de un animal primado con MVA-GnGc que recibió un *boost* con MP12 RVFV, empleando como estímulos los 15 péptidos de la GnGc de RVFV (Tabla 9). En ninguno de los animales utilizados en el ensayo se detectó secreción de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos de la GnGc de RVFV, a pesar de la fuerte respuesta celular obtenida frente al mitógeno inespecífico. Esto nos indica que los péptidos reconocidos por ratones BALB/c no inducen la misma respuesta en la cepa de ratón 129Sv/Ev al presentar estos un haplotipo diferente.

### **3.2.3 Análisis de la respuesta inmune innata mediada por IFN de tipo I en ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc.**

Se detectó un aumento de los niveles de IFN- $\alpha$  en suero con un pico desde las 6 h post-inmunización hasta las 15 h, disminuyendo hasta no detectarse a partir de las 24 h tras la inmunización, con niveles máximos de 80 pg/ml en suero a las 6 h post-inmunización mediante ELISA (Fig. 36A).

A continuación se llevaron a cabo ensayos de actividad funcional donde se observó un pico de actividad antiviral a las 6 h post-inmunización que disminuyó a las 15 h y fue indetectable a partir de las 24 h post-inmunización (Fig. 36B). Los resultados observados tanto en el ensayo de actividad antiviral como en el ELISA IFN- $\alpha$  muestran cinéticas similares lo que indica que la inhibición de la infección en las células era debido a la presencia de IFN- $\alpha$  en suero.

Teniendo en cuenta los niveles de IFN- $\alpha$  inducidos tras la inmunización con MVA-GnGc, y la ausencia de receptores para esta citoquina en animales IFNAR<sup>-/-</sup>, se concluyó que la funcionalidad de la respuesta inmune innata mediada por IFN de tipo I era requerida para la inducción de una respuesta protectora de tipo celular en ausencia de Ac neutralizantes.



**Figura 36.** Detección de IFN tipo I en sueros de ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc recogidos a diferentes tiempos post-inmunización, y ensayados mediante ELISA IFN-α (A) y actividad antiviral (B).

### 3.3 Estudio de la inmunidad y protección frente a RVFV inducida por MVAGn, MVAGc y MVAGnGc en ratones.

#### 3.3.1 Diseño experimental.

Se inmunizaron grupos de 5 ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt con una dosis de  $10^7$  pfu de los MVA: MVA-Gn, MVA-Gc, MVA-GnGc y MVA-GFP, y a los 15 días se desafiaron con la cepa virulenta RVFV 56/74. Los animales fueron monitorizados diariamente durante 21 días.

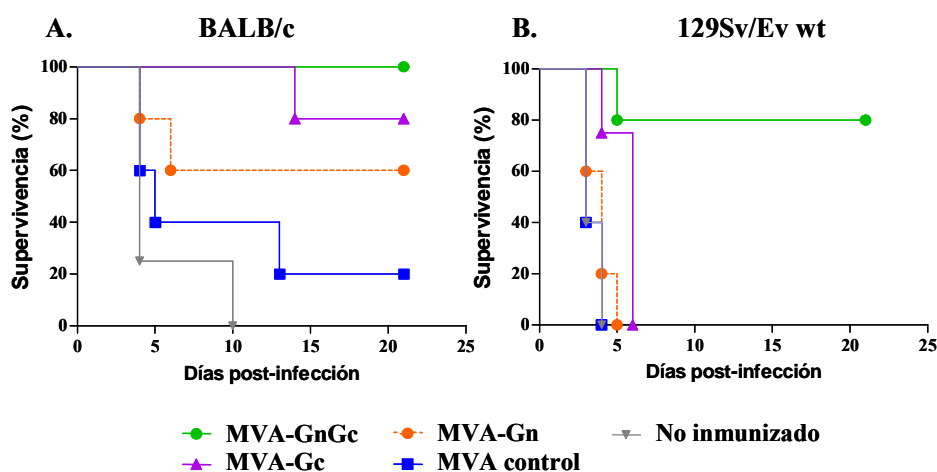
#### 3.3.2 Estudio de la protección frente a RVFV inducida por las vacunas MVAGn, MVAGc y MVAGnGc en ratones.

Se observó una supervivencia del 100% en ratones BALB/c inmunizados con MVA-GnGc con un único animal mostrando signos clínicos leves a 3 y 4 dpi, mientras que en aquellos inmunizados con MVA-Gc la protección fue del 80% observándose signos clínicos compatibles con alteraciones neurológicas en un solo animal a 11 dpi que moría a 14 dpi (Tabla 15). Ambas curvas de supervivencia fueron significativamente diferentes con respecto al grupo MVA control. Sin embargo, la protección en los animales vacunados con MVA-Gn disminuyó al 60% con signos clínicos graves en dos animales de cinco que morían a 4 y 6 dpi, no existiendo diferencias significativas con el grupo MVA control (Fig. 37A).

Por otro lado, la protección en ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc fue del 80% con un animal que moría a 5 dpi (Tabla 15). A diferencia de lo observado en BALB/c, todos los ratones inmunizados con MVA-Gc o MVA-Gn murieron tras el desafío, con un retraso de la mortalidad en los MVA-Gc con respecto al grupo MVA control (Fig. 37B). Los grupos MVA-GnGc y MVA-Gc mostraron datos de supervivencia significativamente diferentes en comparación con el grupo MVA control, a diferencia de los inmunizados con MVA-Gn.

**Tabla 15.** Morbilidad y mortalidad tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt inmunizados con los MVAr.

Grupo	BALB/c		129Sv/Ev wt	
	Morbilidad	Mortalidad	Morbilidad	Mortalidad
MVA-GnGc	1/5	0/5	1/5	1/5
MVA-Gc	1/5	1/5	4/4	4/4
MVA-Gn	2/5	2/5	5/5	5/5
MVA control	4/5	4/5	5/5	5/5
No inmunizado	4/4	4/4	5/5	5/5



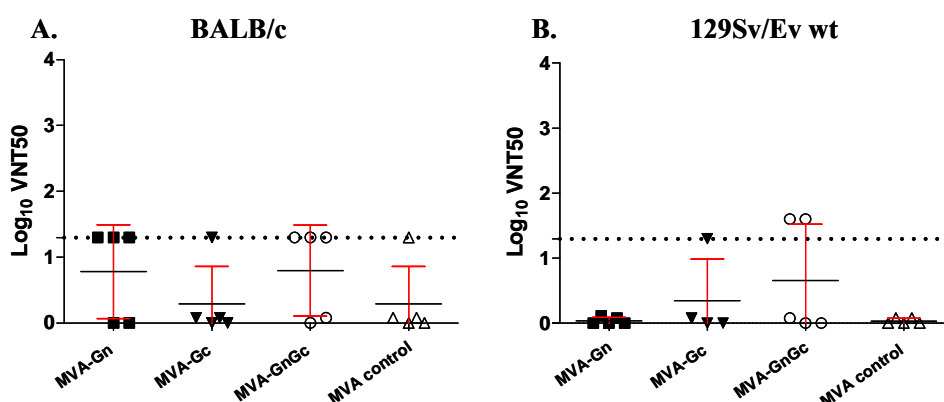
**Figura 37.** Supervivencia en ratones BALB/c (A) y 129Sv/Ev wt (B) inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc y MVA-GnGc tras el desafío.



### 3.3.3 Estudio de la respuesta inmune humoral inducida por vacunas MVA codificando las glicoproteínas de RVFV en ratones.

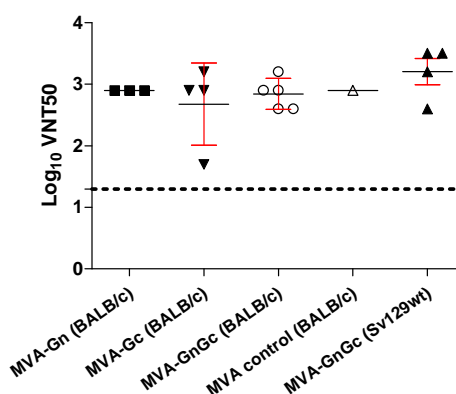
Se detectaron niveles bajos de Ac neutralizantes en los sueros de los ratones BALB/c inmunizados con una dosis de MVA con un título  $VNT_{50}$  de  $1,3\log_{10}$  en tres de cinco ratones inmunizados con MVA-GnGc, en uno de cuatro animales MVA-Gc, en tres de cinco animales MVA-Gn y en uno de cinco de los inmunizados con MVA-GFP (Fig. 38A). La neutralización a la dilución cercana al valor de límite del ensayo ( $1,3\log_{10}$ ) pudo ser inespecífica ya que incluso fue observada en un animal MVA control.

Por otra parte, en ratones 129Sv/Ev wt se observó un título de Ac neutralizantes de  $1,6\log_{10}$  en dos de cinco inmunizados con MVA-GnGc, y un título de  $1,3\log_{10}$  en uno de cinco vacunados con MVA-Gc. No se detectaron Ac neutralizantes en ninguno de los animales inmunizados con MVA-Gn y MVA control (Fig. 38B).



**Figura 38.** Título de Ac neutralizantes predesaño en sueros de ratones BALB/c (A) y 129Sv/Ev wt (B) inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc, MVA-GnGc y MVA control. Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  DS. El límite de detección del ensayo se estableció en  $1,3\log_{10}$  (línea punteada).

Tras el desafío, todos los animales supervivientes incrementaron sus niveles de Ac neutralizantes en suero con títulos  $VNT_{50}$  de  $3\log_{10}$ , incluido el animal MVA control (Fig. 39).

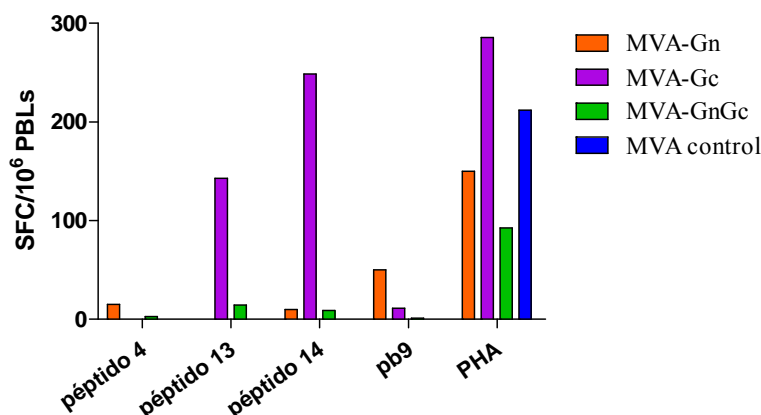


**Figura 39.** Título de Ac neutralizantes postdesafío en sueros de ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt. Los datos de cada grupo están representados como media  $\pm$  DS. El límite de detección del ensayo se estableció en  $1,3\log_{10}$  (línea punteada).

### 3.3.4 Estudio de la respuesta inmune celular inducida por vacunas MVA codificando las glicoproteínas de RVFV en ratones BALB/c.

Se realizaron ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$  con PBLs de ratones BALB/c obtenidos a los 14 días post-inmunización, y en un experimento posterior se procesaron esplenocitos a día 7 y 14 post-inmunización para su estudio en ensayos de ELISPOT IFN- $\gamma$ , ICCS y ensayos de detección de citoquinas.

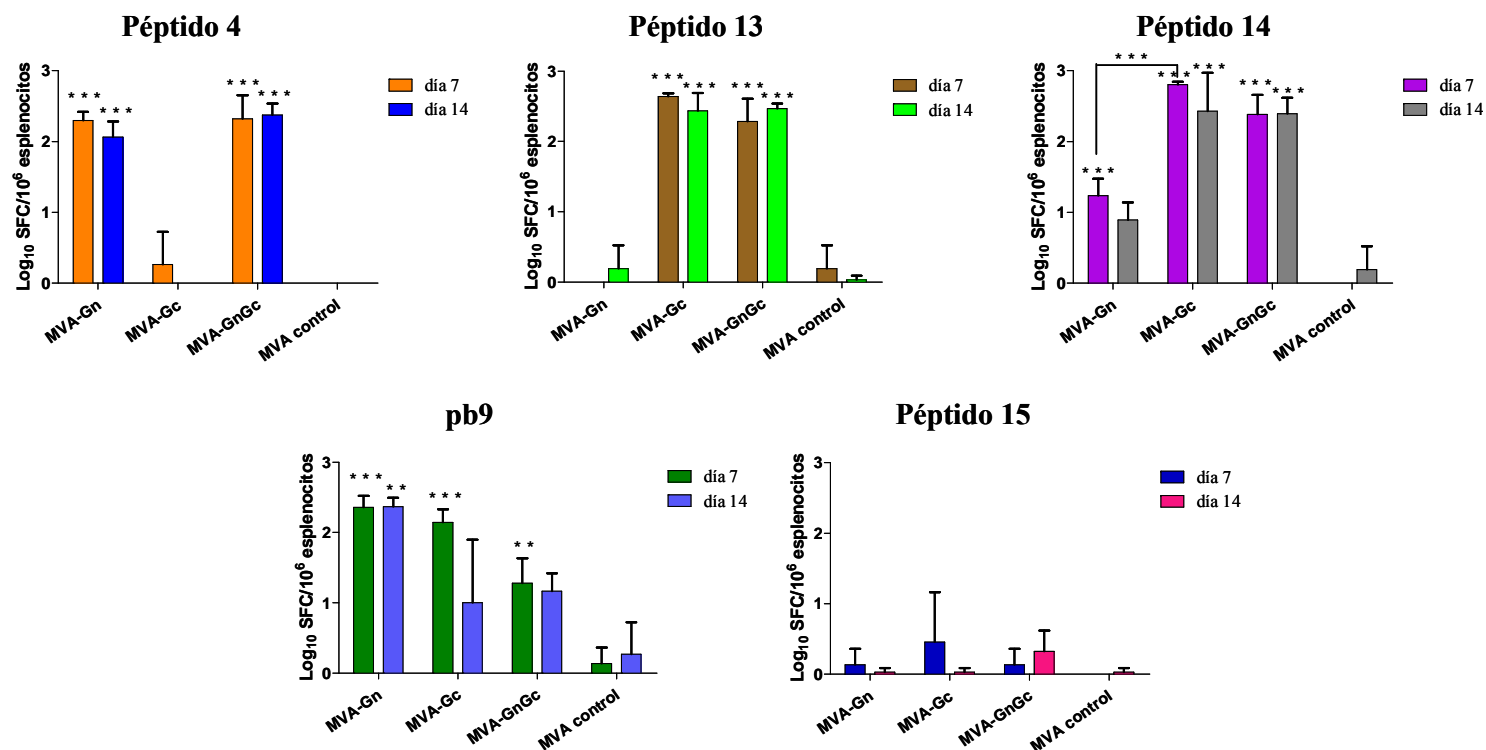
Los *pools* de PBLs de cada grupo fueron estimulados en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 de la GnGc, así como con los controles positivos pb9 y PHA, y el medio como control negativo (Fig. 40). Los animales inmunizados con MVA-Gc mostraron una elevada secreción de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos 13 y 14 correspondientes a la Gc, con niveles bajos de IFN- $\gamma$  frente a pb9. Sin embargo, se detectó una secreción mínima de IFN- $\gamma$  frente al péptido 4 perteneciente a la Gn en los PBLs de animales inmunizados con MVA-Gn, incrementándose dichos niveles ante el pb9. Por último, los animales MVA-GnGc solo respondieron frente a la PHA, con una secreción insignificante de IFN- $\gamma$  frente a los péptidos 4, 13, 14 y pb9.



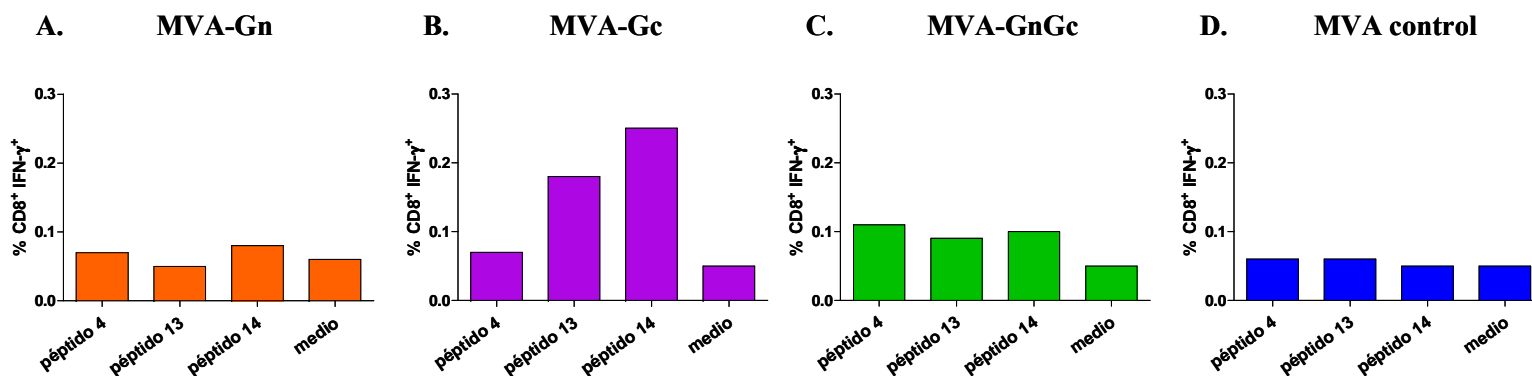
**Figura 40.** ELISPOT IFN- $\gamma$  realizado con *pools* de PBLs de ratones BALB/c inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc, MVA-GnGc y MVA control. Los valores son mostrados por cada grupo restando el valor del medio correspondiente.

Los resultados obtenidos con los esplenocitos a día 7 y 14 post-inmunización mediante ELISPOT mostraron una elevada secreción de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos 13 y 14 en aquellos animales inmunizados con MVA-Gc, con valores superiores a los obtenidos por MVA-GnGc (Fig. 41). Estos resultados estaban en concordancia con los datos obtenidos en los ensayos con PBLs donde este grupo presentaba los valores más elevados de IFN- $\gamma$ . Por otra parte, los esplenocitos de animales inmunizados con MVA-Gn y MVA-GnGc secretaban niveles similares de IFN- $\gamma$  al estimularse con el péptido 4. Interesantemente, se observó en los animales MVA-Gn una mayor respuesta celular en presencia del péptido pb9 en comparación con los grupos MVA-Gc y MVA-GnGc, manteniéndose a día 14 post-inmunización una elevada secreción de IFN- $\gamma$ .

Se detectaron altos porcentajes de linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  en los esplenocitos del animal inmunizado con MVA-Gc a día 14 post-inmunización en presencia de los péptidos 13 y 14 mediante ICCS. Estos niveles fueron superiores a los obtenidos por el animal MVA-GnGc donde solo se observaron valores ligeramente superiores a los obtenidos con el medio, no identificándose estos niveles de respuesta celular en el animal inmunizado con MVA-Gn en presencia del péptido 4 (Fig.42).

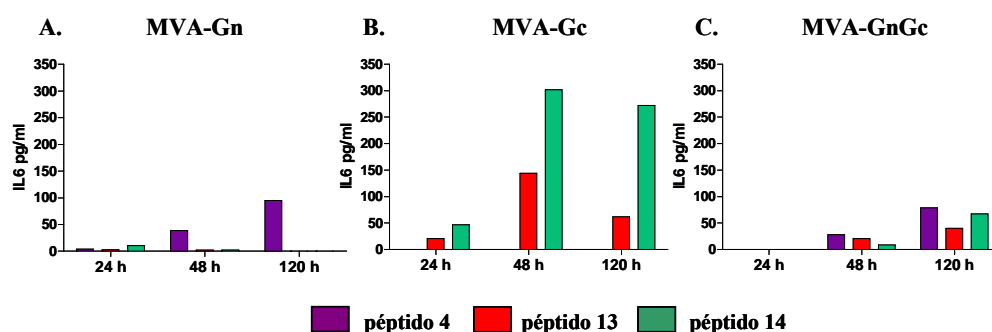


**Figura 41.** ELISPOT IFN- $\gamma$  de esplenocitos de ratones BALB/c obtenidos a día 7 y 14 tras la inmunización con MVA codificando las glicoproteínas Gn y/o Gc. Los estímulos empleados fueron los péptidos 4, 13, 14 y 15 de la GnGc, y como control positivo pb9. Los valores se muestran como media  $\pm$  DS de las SFC por cada  $10^6$  esplenocitos de tres animales, restando el valor del medio correspondiente. Los asteriscos indican el nivel de significancia de cada grupo cuando es comparado con el grupo MVA control mediante ANOVA con un test post-hoc de Dunnet (\*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,001$ ; \*\*\*=  $p < 0,0001$ ).



**Figura 42.** Estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> en presencia de los péptidos GnGc mediante ICCS a día 14 post-inmunización. Los valores están representados como el % de linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretores de IFN-γ correspondientes a un animal inmunizado con una dosis de MVA-Gn (A), MVA-Gc (B), MVA-GnGc (C), y MVA control (D).

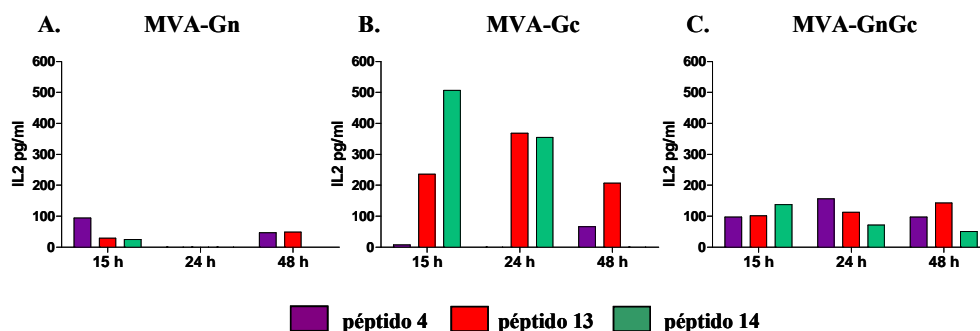
A continuación, se analizaron los ss de esplenocitos obtenidos a día 7 post-inmunización re-estimulados con los diferentes péptidos mediante ELISA, observándose una alta secreción de IL-6 en los animales inmunizados con MVA-Gc en presencia de los péptidos 13 y 14 de la Gc, con valores de hasta 150 pg/ml y 300pg/ml respectivamente a las 48 h, manteniéndose dicha secreción hasta el día 5 de incubación (Fig. 43). Esta respuesta fue también detectada en el grupo MVA-GnGc frente a los péptidos 4, 13 y 14, así como en el grupo MVA-Gn en presencia del péptido 4, pero con valores muy inferiores con respecto al grupo MVA-Gc de 100 pg/ml a día 5 de incubación.



**Figura 43.** Niveles de IL-6 en ss de *pooles* de esplenocitos estimulados a diferentes tiempos. MVA-Gn (A), MVA-Gc (B) y MVA-GnGc (C) a día 7 post-inmunización, se incubaron en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 GnGc. Los datos son mostrados como pg/ml restando el valor del medio correspondiente.

Se detectó una elevada secreción de IL-2 en el grupo MVA-Gc con niveles de hasta 600 pg/ml con los péptidos 13 y 14 a las 15 h y 24 h, valores que disminuían a las 48 h de incubación (Fig. 44). A su vez, se observaron valores moderados de 100-150 pg/ml en el grupo MVA-GnGc en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 desde las 15 h a las 48 h de estimulación, mientras en el grupo MVA-Gn solo se detectaron niveles de 100 pg/ml de IL-2 en presencia del péptido 4 a las 15 h de incubación.

Durante el experimento, se ensayó el grupo MVA control en las mismas condiciones anteriores siendo negativo para la secreción de IL-6 y de IL-2 en presencia de los péptidos 4, 13 y 14, salvo para el control positivo.



**Figura 44.** Niveles de IL-2 en ss de *pooles* de esplenocitos estimulados a diferentes tiempos. MVA-Gn (A), MVA-Gc (B) y MVA-GnGc (C) a día 7 post-inmunización, se incubaron en presencia de los péptidos 4, 13 y 14 GnGc. Los datos son mostrados como pg/ml restando el valor del medio correspondiente.

También se realizaron ELISAs para la detección de IL-4 e IL-5, sin obtenerse en ninguno de los grupos inmunizados secreción de ambas citoquinas, a excepción de los incubados con los mitógenos inespecíficos.

#### 4 ESTUDIO DE LA INMUNIDAD Y PROTECCIÓN FRENTE A RVFV INDUCIDA POR MVA-GnGc EN OVEJAS.

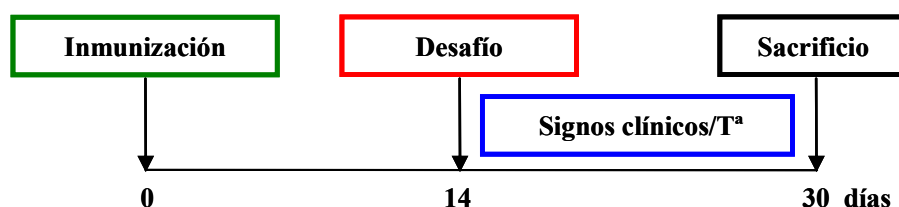
##### 4.1 Diseño experimental de la vacunación con MVA-GnGc en ovejas.

Se emplearon corderos de la raza Ripollés de 5-7 semanas de edad en el momento de la vacunación, y se formaron tres grupos de animales: un grupo inmunizado con MVA-GnGc (n=6), un grupo con MVA-GFP (n=6) y un grupo de inoculados con solución salina (n=7) (Tabla 16). Los corderos se inocularon con una dosis de  $10^8$  pfu de la vacuna MVA-GnGc, ó bien con la vacuna control MVA-GFP. Durante la vacunación, el animal 124 perteneciente al grupo MVA-GnGc recibió una dosis incompleta de la vacuna.

**Tabla 16.** Grupos de corderos empleados.

<b>Grupo experimental</b>	<b>MVA-GnGc (n=6)</b>	<b>MVA control (n=6)</b>	<b>Control no inmunizado (n=7)</b>
<b>n° animal</b>	121-126	127-132	133-140

Después de la vacunación los animales fueron observados diariamente y se tomaron muestras de  $T^a$  corporal. A los 14 días tras la inmunización los corderos se desafiaron con  $10^5$  TCID<sub>50</sub> del aislado virulento RVFV 56/74 (Fig. 45).

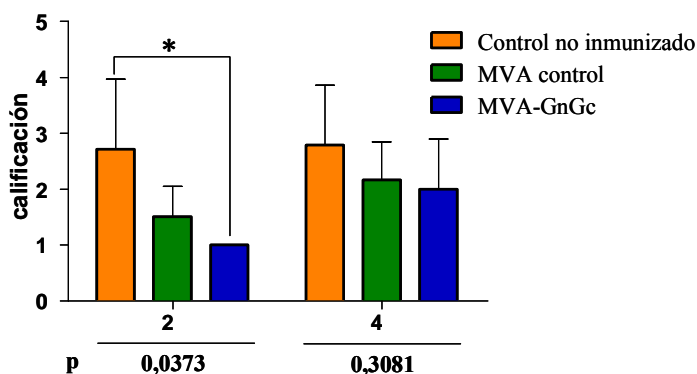
**Figura 45.** Esquema del diseño experimental de eficacia vacunal empleado en ovino.

Tras el desafío viral los animales se observaron diariamente 14 días, registrándose signos clínicos como  $T^a$  corporal, estado general y comportamiento. La fiebre se consideró por encima del umbral de 40,2°C, establecido según la media de las  $T^a$  registradas siete días antes del desafío más tres veces la DS.

#### **4.2 Estudio de la protección en ovejas frente al desafío con RVFV.**

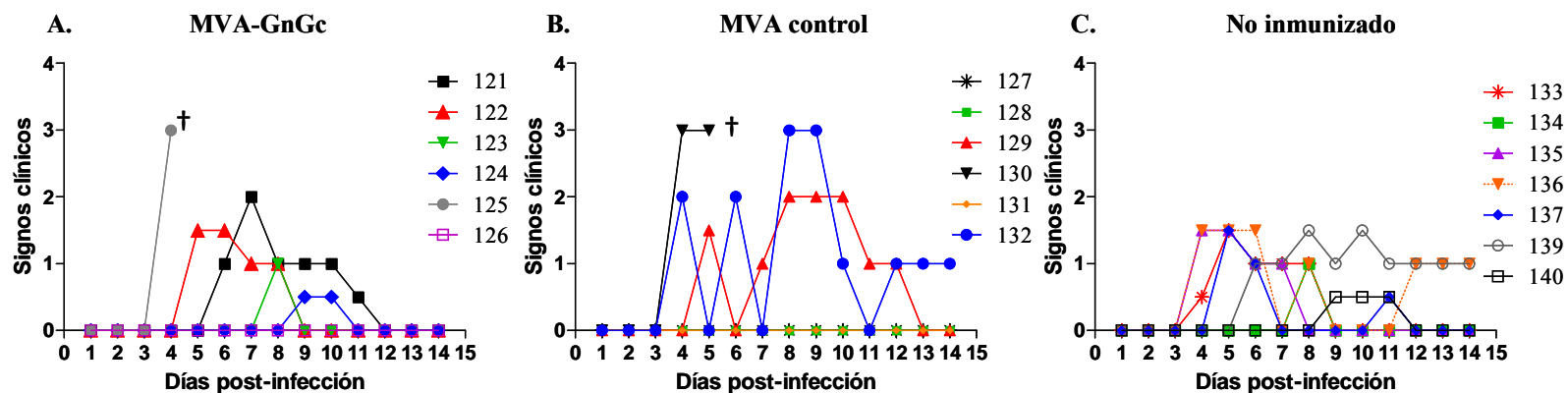
Tras la inmunización de los corderos, tanto con MVA-GnGc como MVA-GFP, no se observó fiebre ni ningún otro signo clínico de enfermedad. Sin embargo, una vez desafiados todos los animales mostraron un aumento de la  $T^a$  y signos clínicos a lo largo del experimento. Uno de los primeros signos clínicos observados fue la presencia de mucosas hiperémicas entre 2 y 4 dpi, siendo los animales no inmunizados los que presentaron una mayor gravedad de las lesiones a 2 dpi en comparación con los animales vacunados con MVA-GnGc (Fig. 46).





**Figura 46.** Detección de la mucosa hiperémica a 2 y 4 dpi en los grupos MVA-GnGc, MVA control y no inmunizado. La valoración está basada en la intensidad de la irritación y se clasificó como: 1 leve, 2 moderado, 3 intenso y 4 muy intenso, representados como media  $\pm$  DS. El asterisco indica diferencias significativas ( $=p < 0,05$ ).

A continuación, se observaron signos clínicos a partir del 4 dpi en el grupo inmunizado con MVA-GnGc, disminuyendo la gravedad de los mismos a 7 dpi y sin detección de signos de infección en ningún animal a partir del 11 dpi (Fig. 47A). Sin embargo, en los animales control vacunados los signos clínicos fueron más graves entre el 4 y 11 dpi, con signos clínicos hasta el final del experimento en uno de ellos (Fig. 47B). Por último, los animales no inmunizados presentaron signos clínicos más moderados que el grupo control inmunizado, pero aún así se prolongaron en dos de ellos hasta la finalización del experimento (Fig. 47C).

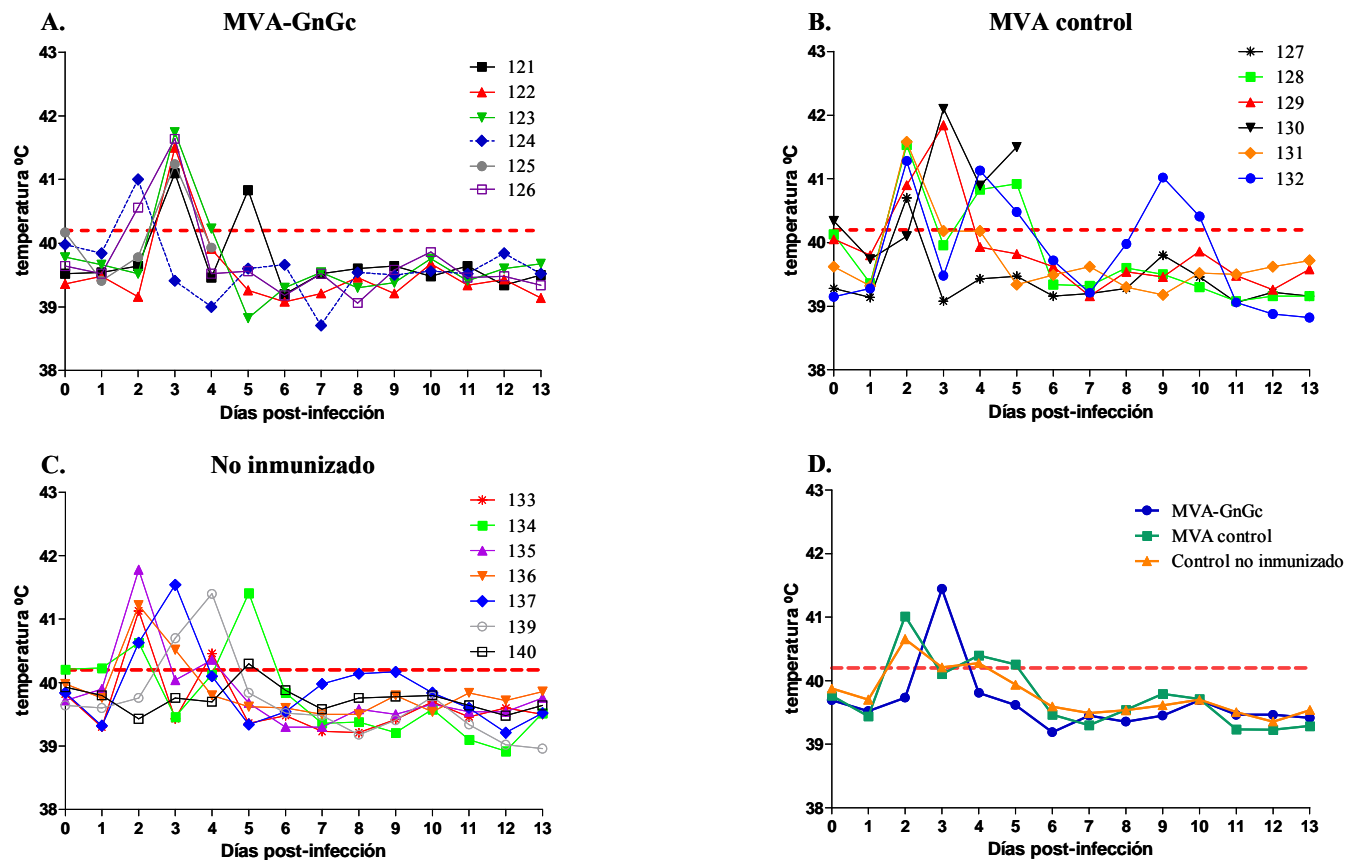


**Figura 47.** Evaluación de los signos clínicos tardíos tras el desafío en los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B) y no inmunizado (C). Se utilizó la siguiente valoración: 0,5-1,5 conjuntivitis leve/grave, 0,5 conjuntivitis bilateral, 1 inapetencia ó comportamiento apático, y 1 dificultad respiratoria.

La conjuntivitis bilateral fue uno de los signos clínicos más frecuentes en los animales de todos los grupos. A su vez, tres animales mostraron signos clínicos graves como falta de apetito, letargia y dificultad respiratoria a partir del 4 dpi. Dos de estos animales eran el 125 del grupo MVA-GnGc y el 130 del grupo MVA-GFP, que morían a 4 y 5 dpi, respectivamente. Un tercer animal, el 132 del grupo MVA-GFP, sobrevivió al desafío aunque presentó palidez extrema en mucosas hasta el final del experimento.

Todos los animales inmunizados con MVA-GnGc tuvieron un pico de fiebre a 3 dpi, menos la 124 que lo tuvo a 2 dpi, y esto pudo ser debido a la inmunización incompleta de este animal (Fig. 48). Más tarde, se detectó un segundo pico de fiebre a 5 dpi en el animal 121 coincidiendo con el desarrollo de una fuerte conjuntivitis bilateral a 7 dpi.

Por otra parte, los animales pertenecientes a ambos grupos controles presentaron una fiebre de mayor duración desde el 2 al 5 dpi, con detección del pico de fiebre a 2 dpi que se adelantaba un día con respecto al grupo MVA-GnGc. Aún así, el inicio de la fiebre no se produjo al mismo tiempo en estos grupos controles ya que algunos animales mostraron el pico de fiebre a 3, 4 o 5 dpi. Asimismo, se detectó un segundo pico de fiebre a 9 dpi en el 132 del grupo MVA control que presentaba mucosas pálidas hasta el final del experimento.



**Figura 48.** Tª corporal de las ovejas de los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B), control no inmunizado (C) registrados diariamente tras el desafío viral. La media de la Tª de cada grupo se muestra en la gráfica D. La Tª umbral para la fiebre está establecida en 40,2°C (línea punteada).

### **4.3 Detección de virus por qRT-PCR y aislamiento viral tras el desafío con RVFV en ovejas.**

Los resultados de viremia obtenidos en sangre a 1 dpi fueron negativos en todos los animales. A continuación, se detectó ARN viral en todos los animales a 3 dpi, a excepción de tres animales pertenecientes al grupo control no inmunizado. A este tiempo, se aisló virus infeccioso en todas las muestras positivas a ARN viral salvo en un animal MVA-GnGc y otro animal no inmunizado (Tabla 17).

A 5 dpi, tanto dos animales MVA-GnGc como dos no inmunizados y cuatro animales MVA control presentaron ARN viral en sangre, aislándose virus infeccioso en una sola muestra, la del animal 131 del grupo MVA control que moría a 5 dpi.

Posteriormente, se identificó ARN viral en algunos animales pertenecientes al grupo MVA control a 7, 9 y 13 dpi, pero ya sin aislamiento de virus a estos tiempos tardíos de desafío.

Por otra parte, solo se detectó ARN viral en los hisopos nasales de dos animales del grupo vacunado con MVA-GnGc a 3 dpi, aislándose virus infeccioso en el 125 que moría a 4 dpi (Tabla 18). Mientras que cuatro de seis animales controles (PBS/MVA-GFP) mostraron tanto altos niveles de ARN viral como de virus infeccioso a 3 dpi.

A 5 dpi se mantuvo la secreción de ARN viral y virus infeccioso en ambos grupos controles, prolongándose la secreción de ARN viral hasta el 7 dpi en al menos un animal de cada grupo control. Con los resultados obtenidos, se observó en el grupo no inmunizado una mayor detección de virus en hisopos nasales que en sangre.

Por último, solo se detectó ARN viral en los hisopos bucales del 125 del grupo MVA-GnGc a 3 dpi, sin aislarse virus infeccioso (Tabla 18). Sin embargo, se identificó ARN viral y virus infeccioso en al menos dos animales de ambos grupos controles a 3 y 5 dpi, manteniéndose la secreción de ARN viral hasta el 7 dpi en el animal 132 del grupo MVA control.

**Tabla 17.** Viremia en sangre tras el desafío analizado mediante qRT-PCR y aislamiento viral. Los valores de ARN viral se muestran como log<sub>10</sub> Copias Genómicas Equivalentes (GEC)/ml y, los valores de virus infeccioso (VI) como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

<sup>a</sup> grupo MVA-GnGc; <sup>b</sup> grupo MVA control; <sup>c</sup> grupo control no inmunizado; <sup>d</sup> día post-infección, neg: negativo.

Muestra	SANGRE											
dpi <sup>d</sup>	1		3		5		7		9		13	
Oveja n <sup>o</sup>	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI
121 <sup>a</sup>	neg		4,7	3,7	neg		neg		neg		neg	
122 <sup>a</sup>	neg		4,8	3,5	neg		neg		neg		neg	
123 <sup>a</sup>	neg		4,4	neg	2	neg	neg		neg		neg	
124 <sup>a</sup>	neg		3,7	1,8	1,9	neg	neg		neg		neg	
125 <sup>a</sup>	neg		6,9	≥ 4,7								
126 <sup>a</sup>	neg		4,2	3	neg		neg		neg		neg	
127 <sup>b</sup>	neg		2,7	1,8	neg		neg		neg		neg	
128 <sup>b</sup>	neg		5,8	4,2	1,9	neg	neg		neg		neg	
129 <sup>b</sup>	neg		7,8	≥ 4,7	4,2	neg	2,7	neg	2,1	neg	neg	
130 <sup>b</sup>	neg		7,3	4,4	3,7	1,8						
131 <sup>b</sup>	neg		2,9	1,8	neg		neg		neg		2,1	neg
132 <sup>b</sup>	neg		6,8	4,9	2,5	neg	2,7	neg	neg		1,6	neg
133 <sup>c</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
134 <sup>c</sup>	neg		neg	neg	neg		neg		neg		neg	
135 <sup>c</sup>	neg		4,9	3	neg		neg		neg		neg	
136 <sup>c</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
137 <sup>c</sup>	neg		5,5	4,5	neg		neg		neg		neg	
139 <sup>c</sup>	neg		3,2	neg	1,6	neg	neg		neg		neg	
140 <sup>c</sup>	neg		2,1	1,8	4,1	neg	neg		neg		neg	

**Tabla 18.** Virus detectado en hisopos nasales y bucales tras el desafío analizado mediante qRT-PCR y aislamiento viral. Los valores de ARN viral se muestran como log<sub>10</sub> GEC/ml y los valores de virus infeccioso como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

<sup>a</sup> grupo MVA-GnGc; <sup>b</sup> grupo MVA control; <sup>c</sup> grupo control no inmunizado; <sup>d</sup> día post-infección, neg: negativo.

Muestra dpi <sup>d</sup>	HISOPO NASAL						HISOPO BUCAL					
	3		5		7		3		5		7	
Oveja n <sup>o</sup>	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI	ARN	VI
121 <sup>a</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
122 <sup>a</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
123 <sup>a</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
124 <sup>a</sup>	2,2	-	neg		neg		neg		neg		neg	
125 <sup>a</sup>	3,4	2,3					2,1	neg				
126 <sup>a</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
127 <sup>b</sup>	neg		-		neg		neg		neg		neg	
128 <sup>b</sup>	3,7	neg	3,6	1,6	2,2		neg		1,8	neg	neg	
129 <sup>b</sup>	3	neg	3	1,6	4,1		2	neg	2,2	neg	neg	
130 <sup>b</sup>	4,2	neg	3,2	neg			1,8	neg	2,4	1,8		
131 <sup>b</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
132 <sup>b</sup>	3,9	2,3	3	1,9	neg		neg		neg		2,6	neg
133 <sup>c</sup>	2,2	2,1	neg		neg		neg		neg		neg	
134 <sup>c</sup>	neg		neg		neg		neg		neg		neg	
135 <sup>c</sup>	2,2	1,8	2,5	1,6	neg		neg		neg		neg	
136 <sup>c</sup>	2,3	2,1	neg		neg		1,67	-	3,5	neg	neg	
137 <sup>c</sup>	4,1	1,8	2,7	1,6	3,1		2,5	-	2	neg	neg	
139 <sup>c</sup>	neg	neg	neg		neg		neg		neg		neg	
140 <sup>c</sup>	neg	neg	neg		neg		neg		neg		neg	

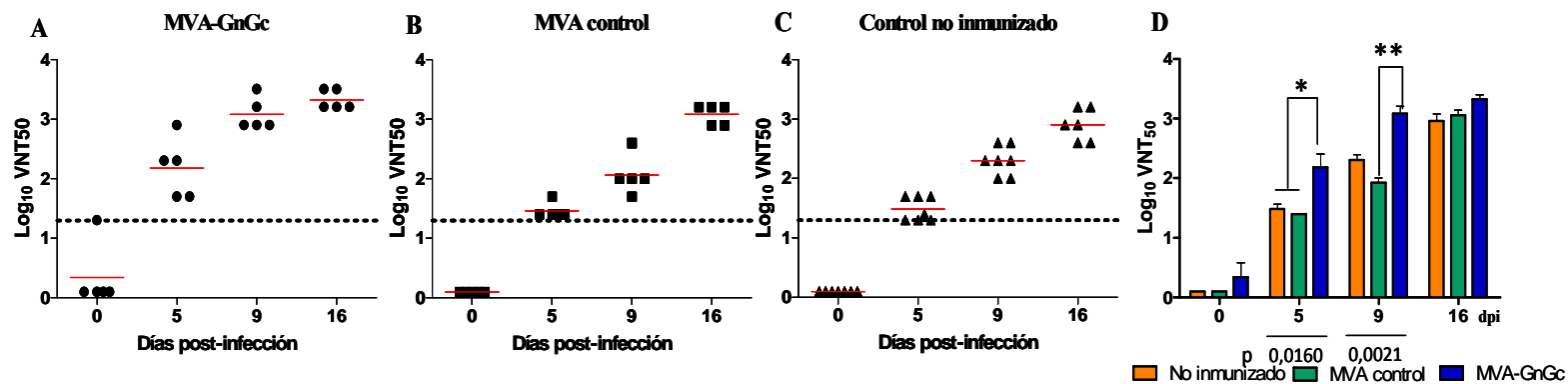
#### **4.4 Análisis de la respuesta inmune humoral en ovejas inmunizadas con MVA-GnGc.**

Se realizaron ensayos de neutralización y ELISA para la detección de Ac específicos frente a RVFV.

Solo se detectaron niveles bajos de Ac neutralizantes ( $VNT_{50}$  de  $1,3 \log_{10}$ ) en el suero de un animal del grupo MVA-GnGc a día 14 post-inmunización, siendo el resto de sueros negativos antes del desafío.

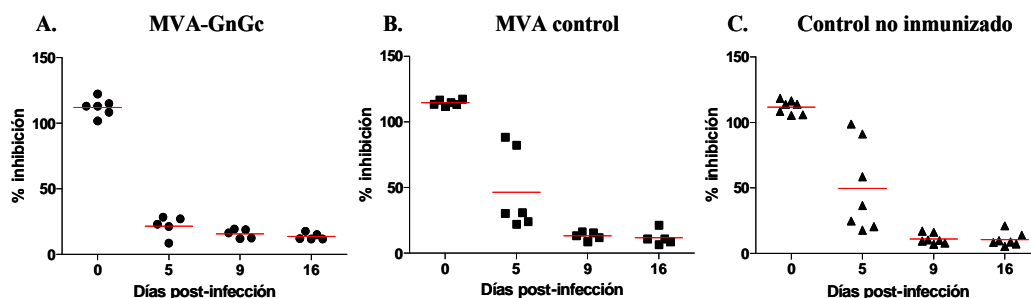
Se observó un incremento significativo del título de Ac neutralizantes en los sueros del grupo MVA-GnGc con respecto al grupo MVA control y control no inmunizado a 5 dpi, manteniéndose estas diferencias significativas a 9 dpi con el grupo control vacunado tras el desafío (Fig. 49). Este resultado indicaba que los animales inmunizados con MVA-GnGc eran capaces de alcanzar rápidamente altos niveles de Ac neutralizantes tras el desafío viral, en comparación con los animales controles. A 16 dpi, se detectaron en los tres grupos niveles similares de Ac neutralizantes.





**Figura 49.** Título de Ac neutralizantes en sueros de los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B), control no inmunizado (C) y media  $\pm$  DS de cada grupo (D), a 0, 5, 9 y 16 dpi. El límite de sensibilidad del ensayo se estableció en 1,3 log<sub>10</sub> (línea punteada). El asterisco indica diferencias significativas (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

Por último, se detectaron niveles altos de Ac anti-N en todos los sueros de los animales inmunizados con MVA-GnGc a 5 dpi mediante ELISA de competición (Fig. 50). Sin embargo, a este tiempo solo se detectaron niveles similares de Ac en ocho de los trece animales controles. Para el resto de animales controles el incremento de los niveles de Ac anti-N se retrasó, produciéndose entre el 6 y 9 dpi.



**Figura 50.** Detección de Ac anti-N en los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B) y control no inmunizado (C) a 0, 5, 9 y 16 dpi mediante ELISA de competición.

Los resultados obtenidos mediante ambos ensayos demostraron que tras el desafío los animales inmunizados con MVA-GnGc desarrollaban un rápido incremento tanto de Ac neutralizantes así como de Ac anti-N, en comparación con ambos grupos controles.



## **VII DISCUSIÓN**



La fiebre del Valle del Rift es una enfermedad endémica en un gran número de países del continente africano y en la península arábiga, donde aparecen periódicamente brotes de la enfermedad que provocan serias consecuencias para el hombre así como graves pérdidas económicas en el ganado.

A su vez, el cambio climático observado en estos últimos años ha favorecido el desplazamiento de mosquitos a zonas más templadas, lo que, junto al incremento del movimiento de animales por el comercio internacional, podría facilitar el establecimiento de diferentes enfermedades en nuevas regiones, hecho ya descrito para otros arbovirus como el virus del Nilo Occidental (WNV) y el virus de la Lengua Azul (BTV) (Pfeffer and Dobler 2010; Weaver and Reisen 2010). A su vez, se ha demostrado una alta competencia vectorial para RVFV en diferentes especies de mosquitos presentes en Europa y América que podrían permitir el establecimiento de la enfermedad (Gargan, Clark et al. 1988; Chevalier, Pepin et al. 2010). Por todo ello, la aparición de brotes epizooticos de RVF en zonas no endémicas sería posible con el consiguiente riesgo tanto para la salud pública como animal.

Actualmente, las medidas de control frente a un brote de RVF basadas en el empleo de insecticidas y en las restricciones del movimiento de ganado carecen de eficacia en África, siendo la vacunación la única estrategia efectiva para el control y la prevención de la enfermedad. A pesar de las diferentes vacunas atenuadas e inactivadas desarrolladas hasta el momento, estas presentan diversos efectos adversos como teratogénesis, abortos o falta de eficacia respectivamente, no estando aprobadas ninguna de ellas para su uso en el hombre ni en el ganado de países no endémicos (Ikegami and Makino 2009). Ante esta situación, diferentes laboratorios están trabajando en el desarrollo de vacunas más seguras y eficaces (subunidades, vacunas ADN y vacunas basadas en vectores virales recombinantes) donde la obtención de vacunas válidas para su uso tanto en el hombre como en el ganado está plenamente justificada en un contexto “*one health*” (Kortekaas 2014).

El objetivo principal de este trabajo ha sido el desarrollo de vacunas basadas en el vector viral recombinante MVA codificando las proteínas más inmunogénicas del RVFV, y la evaluación de la respuesta inmunitaria y protección inducidas tanto en el modelo murino como en el hospedador natural de la enfermedad, la oveja. El

vector MVA fue seleccionado por su elevada seguridad tanto en animales como en el hombre, y por su excelente capacidad para generar una respuesta mediada por linfocitos T frente al antígeno de interés insertado. Junto a las vacunas MVA, también se han empleado en esta tesis vacunas ADN codificando antígenos de RVFV que habían sido desarrolladas anteriormente en nuestro laboratorio (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010).

Uno de los objetivos más importantes en cuanto al desarrollo de una vacuna frente a RVF es su capacidad de inducción y mantenimiento de Ac neutralizantes circulantes capaces de bloquear la infección viral. Las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV inducen Ac neutralizantes, y al mismo tiempo ha sido descrito en ratones un epítipo MHC de clase I en la glicoproteína Gn (Bhardwaj, Heise et al. 2010). Este dato nos indica que, al menos, la glicoproteína Gn es capaz de inducir una respuesta tanto de tipo humoral (con la inducción de Ac neutralizantes) como celular en el animal vacunado contribuyendo a la eliminación de células infectadas en el animal, y a su protección.

Por otra parte, la nucleoproteína N es la proteína más inmunogénica del virus, capaz de inducir elevados títulos de Ac no neutralizantes *in vitro* y una fuerte respuesta linfoproliferativa, implicados en la obtención de una protección parcial mediante mecanismos por el momento desconocidos (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2008; Lagerqvist, Naslund et al. 2009; Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010).

## **1 GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE VACUNAS MVA RECOMBINANTES FRENTE A RVFV.**

El primer objetivo de la tesis se centró en la generación y caracterización de las vacunas basadas en el vector viral recombinante MVA expresando las glicoproteínas Gn y/o Gc, o bien la nucleoproteína N de RVFV

Una vez generados los diferentes vectores MVA recombinantes, se estudió la expresión de los genes insertados mediante IFI y WB con células infectadas. El tamaño de la glicoproteína Gc expresado en células infectadas por MVA-GnGc y MVA-Gc era similar al de la glicoproteína de MP12 RVFV. Al mismo tiempo, se detectó una proteína de menor tamaño en MVA-Gc reconocida solo por el Ac

policlonal anti-Gc, que podría corresponder a una proteína truncada por traducción o procesamiento incompleto o por la acción de alguna enzima proteolítica presente en las células infectadas por MVA.

Por otra parte, el tamaño de la glicoproteína Gn expresada tras la infección con MVA-GnGc y MVA-Gn en diferentes líneas celulares (BHK-21, Vero y DF-1) fue menor con respecto a la glicoproteína de MP12 RVFV. Este hecho podría deberse a la presencia de enzimas proteolíticas expresadas por el MVA que realizaban un corte presumiblemente sobre la región N-terminal de la glicoproteína Gn, aunque esta hipótesis no se ha podido confirmar experimentalmente. A pesar de perder una pequeña parte de su secuencia, esta proteína truncada fue reconocida específicamente por Ac policlonales anti-RVFV, AcMo anti-Gn, y el AcMo anti-tagV5, sugiriendo que no perdería capacidad antigénica ya que la región truncada estaba localizada en el extremo N-terminal.

A pesar de que los niveles de expresión observados con el tagV5 fueron menores para los vectores MVA-GnGc y MVA-Gc, no influyó en los resultados de eficacia en el modelo de ratón descritos a continuación.

## **2 ESTUDIO DE LAS VACUNAS ADN Y/O MVA FRENTE A RVFV EN EL MODELO MURINO BALB/C.**

En un experimento previo, se seleccionó la cepa virulenta y la dosis letal de RVFV para los estudios de protección en ratones BALB/c. Para ello, se emplearon dos aislados virulentos de origen sudafricano; RVFV 56/74 y RVFV AR 20368, procedentes de bovino y de mosquito respectivamente. Tras la inoculación, se observó con el aislado RVFV 56/74 una elevada morbilidad y mortalidad con respecto al RVFV AR 20368, junto a la detección de Ac específicos frente al virus. Las diferencias en patogenicidad observadas entre los dos aislados virulentos no se han estudiado en este trabajo y podrían ser debidas a la variabilidad de la cepa empleada a causa de su origen (mamífero *vs* insecto), a la diferencia en cuanto al número de pases realizados con el virus en cultivos celulares, o bien a la elección inadecuada de la dosis y vía de administración para el desafío de los animales. Estas variables, junto con los factores del hospedador, son capaces de influir en la



patogenicidad obtenida tras una infección experimental (Ross, Bhardwaj et al. 2012). Ninguna de las dos cepas de RVFV infectó a los ratones centinelas que permanecieron en contacto con los inoculados, resultados que difieren con las infecciones experimentales realizadas en ovino (Harrington, Lupton et al. 1980; Busquets, Xavier et al. 2010), donde se sugiere la existencia de transmisión horizontal.

Tras la elección de la cepa virulenta RVFV 56/74, se estableció la dosis letal para ratones BALB/c en  $10^3$  pfu/animal, ya que reproduce los signos clínicos de la enfermedad con resultados similares a otras cepas virulentas como la ZH501 (Spik, Shurtleff et al. 2006; Wallace, Ellis et al. 2006; Lagerqvist, Naslund et al. 2009). Se observó una mayor mortalidad y morbilidad en los animales inoculados con dosis menores de virus, y viceversa, resultado que podría ser debido a la presencia de partículas virales defectivas interferentes (DIPs) generadas tras pases sucesivos en cultivo celular, como ya se ha descrito para el virus Bunyamwera (Kascsak and Lyons 1978; Patel and Elliott 1992). Estas DIPs aumentan cuánto mayor es la concentración del virus interfiriendo en mayor grado con las partículas virales infectivas, lo que da lugar a una disminución en su capacidad de replicación.

El siguiente objetivo de la tesis estaba basado en el estudio de la respuesta inmune y de la protección inducida por las vacunas ADN y/o MVA generadas frente a RVFV. Las diferentes estrategias vacunales codificando las glicoproteínas Gn y Gc confirieron una protección elevada tras el desafío. A pesar de ello, la inmunización con vacunas ADN no alcanzaba la protección completa obtenida por Spik et al., 2006, con diferencias que se atribuyeron a la presencia de niveles elevados de Ac neutralizantes con capacidad protectora. El método de administración podría ser clave en la inducción de estos Ac, ya que en nuestro trabajo fue empleado la vía intramuscular en solución salina que induce mayoritariamente una respuesta Th1, mientras en el otro ensayo la potente respuesta humoral era inducida mediante *gene gun* (Feltquate, Heaney et al. 1997). Aún así, los niveles de protección mejoraban a los de otros experimentos donde no fueron

detectados Ac neutralizantes (Wallace, Ellis et al. 2006). Por otra parte, la vacunación heteróloga ADN/MVA redujo la morbilidad observada con la vacunación homóloga basada en ADN, pero en contra de lo esperado la supervivencia no incrementó, lo que podría ser reflejo de una respuesta inmunitaria distinta tanto en su naturaleza como en su cinética. Asimismo, el empleo de MVA protegió a todos los ratones tras el desafío sin detección de signos clínicos, obteniéndose datos muy similares en el grupo que recibió una dosis conjunta de MVA codificando las glicoproteínas y la nucleoproteína viral. La ausencia de enfermedad observada tras el desafío en los animales inmunizados con MVA correspondía con la ausencia de virus infeccioso y niveles bajos de ARN viral. Esta característica sugería el posible potencial de MVA-GnGc para inducir una inmunidad esterilizante o completa mediante modificaciones en la inmunización como ruta, dosis o empleo de adyuvantes.

Previamente se había descrito el empleo de cepas atenuadas de *Poxvirus* codificando ambas glicoproteínas virales, donde la alta protección observada tras una (Collett 1987) o varias dosis (Wallace, Ellis et al. 2006; Soi, Rurangirwa et al. 2010; Papin, Verardi et al. 2011; Ayari-Fakhfakh, do Valle et al. 2012) estaba mediada por la presencia de Ac neutralizantes. Sin embargo, en este trabajo los niveles de Ac neutralizantes fueron moderados tanto en el grupo MVA como ADN, con títulos que no superaban el límite de detección establecido. La detección de Ac fue confirmada mediante IFI donde no se alteraba sustancialmente la conformación de las proteínas, con resultados negativos mediante WB en condiciones desnaturalizantes. Por otra parte, el empleo del *prime-boost* ADN/MVA no mejoró los niveles de Ac neutralizantes salvo en un animal, detectándose incluso animales negativos. En este caso la inmunidad alcanzada en los ratones vacunados con ADN o con MVA por separado no fue potenciada cuando se empleaba una estrategia heteróloga, donde diversos factores como dosis, método y vía de administración de ambas vacunas pudieron modular el tipo y duración de la respuesta (Estcourt, Letourneau et al. 2005; Stober, Lange et al. 2007).

La ausencia de una clara correlación entre la protección y la presencia de Ac neutralizantes en este ensayo, donde animales con Ac neutralizantes no se protegían

y viceversa, sugería la existencia de otro tipo de respuesta inmunitaria implicada en la protección de dichos animales. Esta hipótesis se apoyó en el hecho de que ambos vectores, principalmente el MVA, son importantes inductores de una respuesta celular mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Gomez, Najera et al. 2008). Ensayos previos sugerían que la protección en ratones inmunizados con la cepa LSDV codificando la NSm y la glicoproteína Gn estaba mediada por la presencia de Ac neutralizantes, junto a una respuesta linfoproliferativa mediada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (Ayari-Fakhfakh, do Valle et al. 2012), mientras que Bhardwaj et al., 2010 habían descrito en ratones un epítipo MHC de clase I en la secuencia de la glicoproteína Gn involucrado en la protección de los mismos. Con estos datos previos, se decidió analizar la importancia de la respuesta celular en la protección obtenida con estas vacunas.

Respecto a las diferentes estrategias vacunales basadas en la nucleoproteína N se demostró que la vacunación con ADN era capaz de inducir niveles elevados de Ac no neutralizantes y una protección parcial tras el desafío, coincidiendo con los datos observados previamente por Lagerqvist et al., 2009. El empleo del *prime-boost* ADN/MVA incrementó tanto la supervivencia como los niveles de Ac anti-N, pero al mismo tiempo aumentó la duración y la gravedad de los signos clínicos (al contrario que lo observado para la vacunación con glicoproteínas). Por último, una dosis de MVA no fue capaz de inducir Ac anti-N a pesar de la alta inmunogenicidad de esta proteína, que fue relacionado con la falta de protección tras el desafío. Sin embargo, esta protección se incrementó con el empleo de dos dosis coincidiendo con el incremento de Ac anti-N. A pesar de observarse niveles de protección similares entre estas estrategias y las basadas en las glicoproteínas, cabe destacar que las glicoproteínas fueron capaces de obtener una mayor protección esterilizante tras el desafío.

Nuestros resultados sugerían que los altos niveles de Ac no neutralizantes frente a la nucleoproteína N estaban relacionados con una protección parcial, que nos indica que estos Ac son capaces de participar mediante una estrategia aún desconocida en la protección frente a la infección. Una posible hipótesis se basa en

la existencia de una respuesta celular mediada por anticuerpos, ya sea mediante una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) o bien a través de una citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) (Jansen van Vuren, Tiemessen et al. 2011). Otro mecanismo similar ha sido descrito para la nucleoproteína NP del virus Influenza, donde, además de los Ac, están involucrados los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la eliminación de la célula infectada (LaMere, Lam et al. 2011). Este tipo de estrategias podría desencadenarse frente a la nucleoproteína N de RVFV, ya que recientemente se ha descrito la importancia de la misma como un potente inmunógeno de linfocitos T humanos desarrollando una respuesta celular amplia e inmunodominante de linfocitos T CD8<sup>+</sup>, con capacidad potencialmente protectora (Xu, Watts et al. 2013).

Continuando con el siguiente objetivo de la tesis, se analizó la respuesta celular inducida en los ratones inmunizados. En este trabajo se han caracterizado tres epítomos, uno en la glicoproteína Gn y dos en la glicoproteína Gc. Uno de ellos, el péptido 4 (SYAHHRTLL) fue descrito previamente por Bhardwaj et al., 2010 como epítomo de la glicoproteína Gn, definido como ligando de MHC de clase I mediante el mismo algoritmo bioinformático. Los otros dos péptidos adicionales fueron el péptido 13 (SYKPMIDQL) y 14 (GGPLKTILL), que hasta la fecha han sido los únicos epítomos restringidos a MHC de clase I identificados sobre la glicoproteína Gc de RVFV. Estos epítomos eran reconocidos por animales inmunizados con MVA y no con ADN, sugiriendo que el MVA por si solo, o bien utilizado como *boost*, era capaz de generar una respuesta de linfocitos T frente a ambas glicoproteínas virales. El fenotipo de las células implicado en esta respuesta fueron linfocitos T CD8<sup>+</sup> con una alta secreción de IFN- $\gamma$  en presencia de los tres péptidos identificados. Por otro lado, no se logró identificar linfocitos T CD4<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  en presencia de los péptidos seleccionados con ninguna de las estrategias vacunales ensayadas. En cualquier caso este ensayo demostró la alta capacidad de inducción de linfocitos T CD8<sup>+</sup> por parte de la vacuna MVA-GnGc como ya se ha demostrado ampliamente para este vector vacunal (Gilbert, Moorthy et al. 2006; Garcia, Bernaldo de Quiros et al. 2011).

Estos resultados fueron confirmados en un experimento posterior donde se obtuvieron porcentajes elevados de linfocitos T CD8<sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>, así como linfocitos T CD8<sup>+</sup> TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>, en presencia de los tres péptidos identificados, en ratones inmunizados con *Adenovirus* recombinantes (Warimwe, Lorenzo et al. 2013).

Ninguno de los péptidos de la nucleoproteína N fue capaz de inducir secreción de IFN- $\gamma$ , lo que podría sugerir la ausencia de epítomos MHC de clase I dentro de la secuencia de la nucleoproteína N. Debido a que los péptidos empleados fueron seleccionados mediante algoritmos bioinformáticos teóricos, no puede descartarse la existencia de epítomos CTLs en la secuencia de la nucleoproteína N para este haplotipo de ratón.

Por otra parte, es interesante destacar que la respuesta frente al epítomo pb9 indujo una mayor secreción de IFN- $\gamma$  cuando este estaba fusionado a la nucleoproteína N que cuando estaba unido a las glicoproteínas GnGc, que indicaba un procesamiento más eficiente de la nucleoproteína N, o bien una captación y presentación por APCs favorecida por su mayor secreción desde células infectadas (Liu, Celma et al. 2008). La prevalencia de una respuesta celular frente al pb9 con respecto a la nucleoproteína N, podría relacionarse con la ausencia de epítomos inmunodominantes de clase I en la secuencia. Este hecho, junto a la ausencia de una respuesta frente a los péptidos seleccionados de la nucleoproteína, sugería que esta proteína era incapaz de inducir en este haplotipo de ratón, tanto en infección natural como mediante diferentes estrategias de vacunación ADN y/o MVA, una respuesta de tipo CTL. Contrariamente, se observó una menor respuesta frente al pb9 con MVA-GnGc, en comparación con la respuesta obtenida con los péptidos. En este caso los epítomos descritos en las glicoproteínas serían inmunodominantes con respecto al epítomo pb9, sin descartarse que el propio procesamiento del pb9 no fuera el correcto, pudiendo estar implicadas las glicoproteínas en el fallo de dicha presentación.

Así, nuestros resultados sugieren fuertemente que la alta protección observada en los ratones inmunizados con MVA-GnGc es debida a una respuesta de tipo celular mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos en ausencia de Ac neutralizantes. Aunque no hemos demostrado la actividad funcional citotóxica de estos linfocitos T,

la alta afinidad que presentaban estos péptidos al MHC de clase I de ratón de haplotipo H2-K(D)<sup>d</sup> hace pensar que el complejo MHC-péptido es reconocido exclusivamente por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (Song, Porgador et al. 1999; Neefjes and Sadaka 2012). Por otra parte, la presencia de una respuesta celular específica detectada a día 7 tras la inmunización así como la alta protección observada en los animales a día 15 post-inmunización, indica que la respuesta inmune implicada en dicha protección es de tipo adquirida. Además, la respuesta de memoria ha sido descrita con el empleo del vector MVA frente a diversos patógenos permitiendo protección a largo plazo (Gomez, Najera et al. 2011; Garcia-Arriaza, Cepeda et al. 2014). Esto sugiere que la respuesta obtenida mediante MVA-GnGc sería similar, cumpliendo así una característica importante para el diseño de vacunas.

### **3 ESTUDIOS EN EL MODELO MURINO 129SV/EV IFNAR<sup>-/-</sup>.**

La vacuna MVA-GnGc fue empleada también en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> donde no inducía protección tras el desafío, resultado que contrastaba con el 100 % de supervivencia observado en BALB/c. Estas diferencias deberían atribuirse a la ausencia de una respuesta inmune innata funcional mediada por IFN de tipo I en IFNAR<sup>-/-</sup>. Para demostrar esta hipótesis, se emplearon ratones wt con el mismo fondo genético, confirmando una elevada protección en 129Sv/Ev wt mientras que los IFNAR<sup>-/-</sup> no sobrevivieron al desafío. Ante la ausencia de Ac neutralizantes en ambas cepas, se sugirió que la respuesta celular era la responsable de la protección siendo la respuesta inmune innata mediada por IFN de tipo I imprescindible para su desarrollo. Se demostró que la vacuna MVA-GnGc inducía secreción de IFN de tipo I, coincidiendo con resultados descritos previamente donde este dato estaba relacionado con la delección del gen B18R responsable de codificar el receptor soluble para el IFN- $\alpha/\beta$  (Waibler, Anzaghe et al. 2007; Waibler, Anzaghe et al. 2009). Recientemente, se ha demostrado en ratones una protección parcial tras el desafío con una única dosis de la cepa atenuada Copenhagen del VV codificando ambas glicoproteínas, requiriendo de dos dosis para alcanzar una alta protección mediada por altos títulos de Ac neutralizantes (Papin, Verardi et al. 2011). La hipótesis que explica las diferencias entre estos resultados y los obtenidos con

MVA-GnGc se basa en la presencia de receptores solubles para IFN- $\alpha/\beta$  codificados por el VV (y ausentes en el vector MVA) que bloquean el desarrollo de una respuesta inmune innata tras la infección, dando lugar a una respuesta inmune adquirida diferente.

Así, el IFN de tipo I inducido tras la inmunización con MVA-GnGc pudo haber participado en el desarrollo de una respuesta adquirida mediante la diferenciación y maduración de células dendríticas (Tough 2004), la colaboración en el procesamiento del antígeno y la presentación cruzada del mismo en las APCs, y la estimulación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Le Bon, Durand et al. 2006) respondiendo éstos de una manera más rápida frente a los antígenos restringidos a MHC de clase I (Hervas-Stubbs, Perez-Gracia et al. 2011).

Recientemente, se ha descrito el empleo de MVA en IFNAR<sup>-/-</sup> frente al CCHFV que, a diferencia de nuestros resultados, obtenía una elevada protección mediante la inducción de anticuerpos. El régimen de vacunación, cinética de expresión antigénica así como el tipo de proteína codificada, pudieron explicar las diferencias en cuanto inducción de respuesta inmune y protección (Buttigieg, Dowall et al. 2014).

En este trabajo hemos observado que el vector vacunal empleado influye en la protección de los ratones IFNAR<sup>-/-</sup>, ya que animales inmunizados con ADN codificando ambas glicoproteínas fueron protegidos completamente tras el desafío, estando dicha protección relacionada con la inducción de títulos elevados de Ac neutralizantes (Lorenzo, Martin-Folgar et al. 2010). Mientras que las vacunas MVA no fueron capaces de inducir Ac neutralizantes, correspondiéndose con la ausencia de protección tras el desafío en este modelo.

Teniendo en cuenta los datos obtenidos con las vacunas ADN y MVA en ratones IFNAR<sup>-/-</sup> y *wild type*, la respuesta por linfocitos T CD8<sup>+</sup> parece tener un papel importante en la protección de los animales. Los epítomos restringidos a MHC de clase I identificados en este trabajo están efectivamente restringidos a un determinado haplotipo de ratón, ya que estos no funcionaron en ratones 129Sv/Ev, con haplotipo diferente. A pesar de ello, la identificación de epítomos de linfocitos T en el hombre y en los rumiantes sería una herramienta muy interesante a tener en

cuenta para el futuro desarrollo de nuevas estrategias de control y prevención de la enfermedad, así como para estudiar la implicación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> en la protección frente a la enfermedad.

#### **4 ESTUDIO DE LA INMUNOGENICIDAD Y DE LA PROTECCIÓN DE MVA-Gn Y MVA-Gc EN EL MODELO MURINO.**

Por último, se analizó la importancia de cada glicoproteína viral de RVFV en la protección de los animales mediante el empleo del vector viral recombinante MVA. Para ello, se diseñaron dos nuevas vacunas MVA con el fin de analizar el papel de cada glicoproteína en la protección observada en ratones. Esta estrategia vacunal fue elegida por los resultados obtenidos previamente donde la inmunización con MVA-GnGc en ratones confería una alta protección debido a una potente respuesta inmune celular en ausencia de Ac neutralizantes. En experimentos previos, la glicoproteína Gn inducía Ac neutralizantes con capacidad protectora tras el desafío tanto en ratones (Gorchakov, Volkova et al. 2007) como en ovejas (Kortekaas, Antonis et al. 2012), identificándose recientemente una respuesta celular específica en el modelo murino (Bhardwaj, Heise et al. 2010). Por otra parte, se han descrito AcMo con capacidad neutralizante frente a la glicoproteína Gc (Besselaar and Blackburn 1991), observándose un menor nivel de protección en ratones inmunizados (Dalrymple 1989).

En términos de eficacia la vacuna MVA basada en la glicoproteína Gc funcionó mejor que con la Gn en ratones BALB/c, con una diferencia del 20% en los ratios de protección, sin existir correlación con la presencia de Ac neutralizantes. Asimismo, los niveles secretados de IFN- $\gamma$  tras la inmunización con MVA-Gc fueron incluso superiores a los obtenidos con ambas glicoproteínas, mientras que con el empleo de MVA-Gn esta respuesta disminuyó. Con los resultados obtenidos, se concluyó que la potente respuesta celular de linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  inducida por MVA-Gc confería un alto porcentaje de protección tras el desafío en ratones BALB/c, siendo esta protección más completa cuando codificaba ambas glicoproteínas. Sin embargo, cuando se utilizó MVA-Gn la respuesta celular



generada no protegía tras el desafío, sugiriéndose que para la protección mediante el empleo de esta proteína era imprescindible la inducción de Ac neutralizantes.

Por otro lado, la respuesta obtenida frente a pb9 fue superior en los animales MVA-Gn, lo que parece confirmar que ante la presencia de epítomos menos inmunodominantes de clase I en la secuencia de Gn esta respuesta se incrementa hacia pb9, al igual que ya ocurría con MVA-N.

A su vez, se pudo detectar una elevada secreción de IL-2 e IL-6 en presencia de los péptidos 13 y 14 de Gc tras la inmunización con MVA-Gc, siendo estos niveles moderados en los animales MVA-Gn y MVA-GnGc. Ambas citoquinas están implicadas en la fuerte respuesta inmune de tipo celular, coincidiendo con los resultados obtenidos en los ensayos de ELISPOT e ICCS mediante el empleo de estas vacunas. Así, tras el desafío de los animales inmunizados la IL-2 podría estimular la división celular de los linfocitos T y la liberación de IFN- $\gamma$ , y a su vez, activar células NK y monocitos facilitando la lisis de células infectadas. Por otra parte, la IL-6 secretada sería capaz de activar linfocitos T citotóxicos (Male 2006), incrementando la respuesta celular generada. Todo ello parece indicar que ante la infección, el animal previamente inmunizado es capaz de eliminar rápidamente las células infectadas mediante una potente respuesta celular.

Por otra parte, no se detectaron citoquinas encargadas de la respuesta inmune humoral como IL-4 e IL-5, ambas producidas por linfocitos Th2, coincidiendo con el bajo título de Ac observado en suero.

Por último, cuando se estudió la respuesta de estas vacunas en 129Sv/Ev wt solo sobrevivían los ratones vacunados con ambas glicoproteínas. Esto podría ser debido a la mayor susceptibilidad a la infección por RVFV de los 129Sv/Ev con respecto a los BALB/c, con tiempo medio de supervivencia de 3-4 días en comparación con los de BALB/c de 6 días. Aún así, no se puede descartar que las diferencias observadas se correspondieran a la existencia de un posible epítomo CTL presente en la secuencia completa de GnGc, no estando en su totalidad en las secuencias individuales de Gn o Gc.

Una vez analizada la respuesta inmunitaria y protección inducida por las diferentes estrategias vacunales empleadas en el modelo murino, se concluyó que la vacuna MVA-GnGc podía ser considerada un candidato vacunal potencial para uso humano y veterinario frente a RVFV.

## **5 ESTUDIO DE LAS VACUNAS MVA FRENTE A RVFV EN OVEJAS.**

El desarrollo de una vacuna veterinaria para combatir la RVF es necesaria, siendo ésta la primera línea de defensa frente a la expansión de la enfermedad hacia el hombre (Bird and Nichol 2012).

Tras el estudio de la eficacia vacunal de MVA-GnGc en ratones, se llevó a cabo un ensayo en el hospedador natural la oveja con el fin de contrastar los resultados obtenidos. Para ello, se emplearon corderos de 5-7 semanas de edad de raza europea, considerados hospedadores naturales de RVFV, y a su vez, animales diana a los que van dirigidos los programas de vacunación para el control y prevención de esta enfermedad. Los animales fueron inmunizados con una dosis de MVA-GnGc como en el modelo murino. Tras el desafío, todos los animales presentaron signos clínicos, muriendo únicamente dos animales que pertenecían a los grupos vacunados con MVA. Este hecho nos hizo pensar que la inmunización de ovejas con el vector vacunal MVA podría hacerlas más susceptibles a la infección con RVFV. Esta característica no se había observado previamente en ovejas con otros vectores basados en poxvirus, ni se había detectado esta circunstancia en los diferentes modelos de ratón aquí empleados.

A pesar de ello, ciertos efectos protectores fueron observados tras el empleo de MVA-GnGc en ovejas como el retraso de 24 h en el inicio de la fiebre con respecto a ambos grupos controles. Este hecho se apoyó en el inicio temprano de fiebre detectado en el animal que había recibido una dosis incompleta de la vacuna. El pico de fiebre en el grupo MVA-GnGc fue observado a 3 dpi, detectándose a este tiempo virus infeccioso en todos ellos. Cabe destacar, que el pico de fiebre producido por la infección con RVFV coincide en el tiempo con el pico de viremia en el animal, por lo que al no realizarse toma de muestras a 2 dpi no se puede descartar que los controles presentaran niveles de viremia más elevados. Además, se

demostró la capacidad que tenía MVA-GnGc en ovejas para disminuir la carga viral en secreciones nasales y bucales, que, en un escenario natural, reduciría la diseminación del virus a animales y personas que estuvieran en contacto con el animal infectado. Solo se detectaron niveles bajos de Ac neutralizantes en el suero predesafío de un animal MVA-GnGc, mientras que tras el desafío se observó un rápido incremento en el título de Ac neutralizantes en el grupo MVA-GnGc con respecto a ambos grupos controles, indicativo de un efecto de primado producido por la vacuna. La presencia de estos Ac neutralizantes durante los primeros días de la infección apoyaba los resultados observados en cuanto a la reducción de la replicación viral y distribución del virus, obteniéndose así un retraso en la fiebre y una menor secreción viral en el animal vacunado.

Por otra parte, el grupo MVA-GnGc desarrolló una respuesta de Ac anti-N más rápida que ambos grupos controles tras el desafío. Estos datos fueron inesperados, dado que los animales no habían sido inmunizados frente a esta proteína viral, por lo que es posible que el incremento de la respuesta de Ac neutralizantes dirigida frente a las glicoproteínas acelere la inducción de Ac anti-N. Este hecho podría producirse tras la neutralización de las partículas virales o células infectadas, acelerando el procesamiento y presentación antigénica de la nucleoproteína N. Las diferencias observadas en la cinética de Ac frente a la proteína más inmunogénica del virus, podría ayudar en futuros ensayos a distinguir animales vacunados de los no vacunados tras una infección experimental.

Nuestros resultados sugieren que una dosis de MVA-GnGc en corderos no confiere una protección completa frente a la enfermedad. Sin embargo, es capaz de controlarla al menos parcialmente, detectándose un retraso en el inicio y severidad de los signos clínicos, así como una disminución en la duración de la enfermedad. Además, se observó tanto una menor cantidad y duración de la viremia como de la descarga viral. Los datos obtenidos no alcanzaron la protección inducida por otros poxvirus utilizados en ovejas, donde se había empleado una cepa atenuada de LSDV (Wallace, Ellis et al. 2006; Soi, Rurangirwa et al. 2010). Cabe destacar que en ambos experimentos se había inmunizado con dos dosis y no con una dosis como se

había realizado en este trabajo, que pudo influir en la protección obtenida junto a las diferencias en el vector. Así, Wallace et al., 2009 demostraron una elevada protección de los animales vacunados, y Soi et al., 2010 ausencia de viremia y fiebre tras la infección, donde se sugería que dicha protección estaba mediada por la presencia de Ac neutralizantes.

Ante estos resultados, se debe trabajar en la optimización de la vacuna MVA en ovejas. El empleo de otra vía de administración como la intramuscular o intradérmica en lugar de la subcutánea, así como la construcción del vector vacunal codificando la proteína de interés bajo un promotor de expresión temprana más potente, podría permitir en un futuro el incremento de la respuesta inmune y protección por esta vacuna. Además, el empleo de adyuvantes o bien el incremento de virus recombinante en la dosis vacunal, podrían ayudar a mejorar la respuesta obtenida (Garcia-Arriaza and Esteban 2014).

Diferentes ensayos realizados con MVA en animales frente enfermedades como Peste de Pequeños Rumiantes (PPR) en cabras (Chandran, Reddy et al. 2010), AHSV en ponies y caballos (Chiam, Sharp et al. 2009; Alberca, Bachanek-Bankowska et al. 2014), y el virus sincitial respiratorio bovino (bSRV) en terneros (Antonis, van der Most et al. 2007), emplearon al menos dos dosis de MVA obteniéndose una elevada protección mediada por la presencia de una respuesta humoral. Debido a que en nuestro experimento se utilizó una dosis vacunal, sería interesante conocer si la respuesta inducida con el empleo de dos dosis mejoraba nuestros resultados.

Debido a la importancia que tienen los Ac neutralizantes en la protección frente a RVFV, y dado que el vector vacunal MVA es un gran inductor de una respuesta celular mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, nos hizo pensar en mejorar este vector vacunal para que su respuesta inmune fuera dirigida hacia una de tipo humoral. Para ello, se han descrito modificaciones en el genoma del vector MVA mediante la delección de determinados genes que puedan mejorar este tipo de respuesta (Garcia-Arriaza, Gomez et al. 2014), siendo interesante realizar este tipo de ensayos en un futuro.



## **VIII    CONCLUSIONES**



1. Se han generado virus MVA recombinantes que expresan las glicoproteínas Gn y/o Gc (MVA-GnGc, MVA-Gn y MVA-Gc), y la nucleoproteína N (MVA-N) del RVFV para su empleo como vectores vacunales.
2. La estrategia vacunal basada en una dosis de MVA-GnGc induce una protección completa y esterilizante en ratones BALB/c tras el desafío con RVFV, mediada por una potente inmunidad celular en ausencia de anticuerpos neutralizantes y dependiente de una respuesta funcional al IFN de tipo I. Por el contrario, esta misma estrategia empleando la nucleoproteína N no fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora tras el desafío.
3. La estrategia vacunal basada en ADN expresando las glicoproteínas Gn y Gc desencadena una sólida protección relacionada con la inducción de una respuesta inmune tanto humoral como celular, aunque no evita la aparición de signos clínicos en ratones BALB/c. Por otra parte, la expresión de la nucleoproteína N en esta estrategia induce una fuerte respuesta de anticuerpos obteniéndose un nivel de protección parcial.
4. La estrategia vacunal heteróloga basada en ADN/MVA codificando ambas glicoproteínas reduce los signos clínicos pero no la mortalidad con respecto a la vacunación homóloga de ADN, que correlaciona con un incremento en la respuesta celular en ratones BALB/c. Sin embargo, la nucleoproteína N empleada en esta misma estrategia incrementó la respuesta humoral, sin mejorar los datos en cuanto a protección.
5. Se han identificado tres epítomos MHC de clase I en ratones, uno perteneciente a la glicoproteína Gn y dos correspondientes a la glicoproteína Gc del RVFV, capaces de estimular de forma específica la secreción de IFN- $\gamma$  en una población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Por otra parte, ninguno de los péptidos de la nucleoproteína N del RVFV previamente seleccionados mediante predicción



bioinformática fueron capaces de estimular la secreción de IFN- $\gamma$  mediante estos ensayos.

6. La estrategia vacunal basada en el vector MVA codificando la glicoproteína Gc confirma que la inducción de una respuesta celular específica de Gc en ausencia de anticuerpos neutralizantes es suficiente para inducir niveles de protección elevados en el modelo de ratón BALB/c.
7. La inmunización con una dosis de MVA-GnGc en ovejas controla parcialmente la infección por el RVFV en cuanto a la duración de la viremia y secreción viral. A pesar de no detectarse anticuerpos neutralizantes tras la inmunización, se observó un rápido incremento de estos tras el desafío con respecto a los grupos control.

## **IX BIBLIOGRAFÍA**



- Adam, A. A., M. S. Karsany, et al. (2010). "Manifestations of severe Rift Valley fever in Sudan." *Int J Infect Dis* 14(2): e179-180.
- Ahmad, K. (2000). "More deaths from Rift Valley fever in Saudi Arabia and Yemen." *Lancet* 356(9239): 1422.
- Ahmed Kamal, S. (2011). "Observations on rift valley fever virus and vaccines in Egypt." *Virol J* 8: 532.
- Alberca, B., K. Bachanek-Bankowska, et al. (2014). "Vaccination of horses with a recombinant modified vaccinia Ankara virus (MVA) expressing African horse sickness (AHS) virus major capsid protein VP2 provides complete clinical protection against challenge." *Vaccine* 32(29): 3670-3674.
- Amato, R. J., R. E. Hawkins, et al. (2010). "Vaccination of metastatic renal cancer patients with MVA-5T4: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study." *Clin Cancer Res* 16(22): 5539-5547.
- Amraoui, F., G. Krida, et al. (2012). "Culex pipiens, an experimental efficient vector of West Nile and Rift Valley fever viruses in the Maghreb region." *PLoS One* 7(5): e36757.
- Anderson, G. W., Jr., J. A. Rosebrock, et al. (1991). "Infection of inbred rat strains with Rift Valley fever virus: development of a congenic resistant strain and observations on age-dependence of resistance." *Am J Trop Med Hyg* 44(5): 475-480.
- Anderson, G. W., Jr., T. W. Slone, Jr., et al. (1987). "Pathogenesis of Rift Valley fever virus (RVFV) in inbred rats." *Microb Pathog* 2(4): 283-293.
- Anderson, G. W., Jr., T. W. Slone, Jr., et al. (1988). "The gerbil, *Meriones unguiculatus*, a model for Rift Valley fever viral encephalitis." *Arch Virol* 102(3-4): 187-196.
- Andriamandimby, S. F., A. E. Randrianarivo-Solofoniaina, et al. (2010). "Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009." *Emerg Infect Dis* 16(6): 963-970.
- Antonis, A. F., R. G. van der Most, et al. (2007). "Vaccination with recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing bovine respiratory syncytial virus (bRSV) proteins protects calves against RSV challenge." *Vaccine* 25(25): 4818-4827.
- Anyamba, A., J. P. Chretien, et al. (2009). "Prediction of a Rift Valley fever outbreak." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(3): 955-959.
- Ayari-Fakhfakh, E., T. Z. do Valle, et al. (2012). "MBT/Pas mouse: a relevant model for the evaluation of Rift Valley fever vaccines." *J Gen Virol* 93(Pt 7): 1456-1464.
- Baer, A., D. Austin, et al. (2012). "Induction of DNA damage signaling upon Rift Valley fever virus infection results in cell cycle arrest and increased viral replication." *J Biol Chem* 287(10): 7399-7410.
- Barnard, B. J. (1979). "Rift Valley fever vaccine--antibody and immune response in cattle to a live and an inactivated vaccine." *J S Afr Vet Assoc* 50(3): 155-157.
- Barnard, B. J. and M. J. Botha (1977). "An inactivated rift valley fever vaccine." *J S Afr Vet Assoc* 48(1): 45-48.

- Beer, M., F. J. Conraths, et al. (2013). "'Schmallenberg virus'--a novel orthobunyavirus emerging in Europe." *Epidemiol Infect* 141(1): 1-8.
- Besselaar, T. G. and N. K. Blackburn (1991). "Topological mapping of antigenic sites on the Rift Valley fever virus envelope glycoproteins using monoclonal antibodies." *Arch Virol* 121(1-4): 111-124.
- Bhardwaj, N., M. T. Heise, et al. (2010). "Vaccination with DNA plasmids expressing Gn coupled to C3d or alphavirus replicons expressing gn protects mice against Rift Valley fever virus." *PLoS Negl Trop Dis* 4(6): e725.
- Bird, B. H., M. L. Khristova, et al. (2007). "Complete genome analysis of 33 ecologically and biologically diverse Rift Valley fever virus strains reveals widespread virus movement and low genetic diversity due to recent common ancestry." *J Virol* 81(6): 2805-2816.
- Bird, B. H., T. G. Ksiazek, et al. (2009). "Rift Valley fever virus." *J Am Vet Med Assoc* 234(7): 883-893.
- Bird, B. H. and S. T. Nichol (2012). "Breaking the chain: Rift Valley fever virus control via livestock vaccination." *Curr Opin Virol* 2(3): 315-323.
- Boiro, I., O. K. Konstantinov, et al. (1987). "[Isolation of Rift Valley fever virus from bats in the Republic of Guinea]." *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 80(1): 62-67.
- Boshra, H., G. Lorenzo, et al. (2011). "Rift valley fever: recent insights into pathogenesis and prevention." *J Virol* 85(13): 6098-6105.
- Boshra, H., G. Lorenzo, et al. (2011). "A DNA vaccine encoding ubiquitinated Rift Valley fever virus nucleoprotein provides consistent immunity and protects IFNAR(-/-) mice upon lethal virus challenge." *Vaccine* 29(27): 4469-4475.
- Botros, B., A. Omar, et al. (2006). "Adverse response of non-indigenous cattle of European breeds to live attenuated Smithburn Rift Valley fever vaccine." *J Med Virol* 78(6): 787-791.
- Bouloy, M. and R. Flick (2009). "Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: current and future applications for the development of therapeutics and vaccines." *Antiviral Res* 84(2): 101-118.
- Bouloy, M. and R. Flick (2009). "Reverse genetics technology for Rift Valley fever virus: Current and future applications for the development of therapeutics and vaccines." *Antiviral Research* 84(2): 101-118.
- Bouloy, M., C. Janzen, et al. (2001). "Genetic evidence for an interferon-antagonistic function of rift valley fever virus nonstructural protein NSs." *J Virol* 75(3): 1371-1377.
- Bouloy, M. and F. Weber (2010). "Molecular biology of rift valley Fever virus." *Open Virol J* 4: 8-14.
- Breathnach, C. C., R. Rudersdorf, et al. (2004). "Use of recombinant modified vaccinia Ankara viral vectors for equine influenza vaccination." *Vet Immunol Immunopathol* 98(3-4): 127-136.
- Brun, A., E. Albina, et al. (2008). "Antigen delivery systems for veterinary vaccine development. Viral-vector based delivery systems." *Vaccine* 26(51): 6508-6528.

- Busquets, N., F. Xavier, et al. (2010). "Experimental infection of young adult European breed sheep with Rift Valley fever virus field isolates." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(7): 689-696.
- Buttigieg, K. R., S. D. Dowall, et al. (2014). "A novel vaccine against Crimean-Congo Haemorrhagic Fever protects 100% of animals against lethal challenge in a mouse model." *PLoS One* 9(3): e91516.
- Caplen, H., C. J. Peters, et al. (1985). "Mutagen-directed attenuation of Rift Valley fever virus as a method for vaccine development." *J Gen Virol* 66 ( Pt 10): 2271-2277.
- Caroline, A. L., D. S. Powell, et al. (2014). "Broad spectrum antiviral activity of favipiravir (T-705): protection from highly lethal inhalational Rift Valley Fever." *PLoS Negl Trop Dis* 8(4): e2790.
- Carroll, M. W. and B. Moss (1997). "Host range and cytopathogenicity of the highly attenuated MVA strain of vaccinia virus: propagation and generation of recombinant viruses in a nonhuman mammalian cell line." *Virology* 238(2): 198-211.
- Coackley, W., A. Pini, et al. (1967). "Experimental infection of cattle with pantropic Rift Valley fever virus." *Res Vet Sci* 8(4): 399-405.
- Coban, C., K. Kobiyama, et al. (2011). "Novel strategies to improve DNA vaccine immunogenicity." *Curr Gene Ther* 11(6): 479-484.
- Coetzer, J. A. (1977). "The pathology of Rift Valley fever. I. Lesions occurring in natural cases in new-born lambs." *Onderstepoort J Vet Res* 44(4): 205-211.
- Coetzer, J. A. and B. J. Barnard (1977). "Hydrops amnii in sheep associated with hydranencephaly and arthrogryposis with wesselsbron disease and rift valley fever viruses as aetiological agents." *Onderstepoort J Vet Res* 44(2): 119-126.
- Coetzer, J. A. and K. G. Ishak (1982). "Sequential development of the liver lesions in new-born lambs infected with Rift Valley fever virus. I. Macroscopic and microscopic pathology." *Onderstepoort J Vet Res* 49(2): 103-108.
- Collett, M. S., Keegan, K., Hu, S., Sridhar, P., Purchio, A. F., Ennis, W. H., et al. (1987). "Protective subunit immunogens to Rift Valley fever from bacteria and recombinant vaccinia virus." *The Biology of Negative Strand Viruses* Chapter 43, p321-329.
- Collett, M. S., A. F. Purchio, et al. (1985). "Complete nucleotide sequence of the M RNA segment of Rift Valley fever virus." *Virology* 144(1): 228-245.
- Cottingham, M. G. and M. W. Carroll (2013). "Recombinant MVA vaccines: dispelling the myths." *Vaccine* 31(39): 4247-4251.
- Chandran, D., K. B. Reddy, et al. (2010). "MVA recombinants expressing the fusion and hemagglutinin genes of PPRV protects goats against virulent challenge." *Indian J Microbiol* 50(3): 266-274.
- Chevalier, V., M. Pepin, et al. (2010). "Rift Valley fever--a threat for Europe?" *Euro Surveill* 15(10): 19506.
- Chiam, R., E. Sharp, et al. (2009). "Induction of antibody responses to African horse sickness virus (AHSV) in ponies after vaccination with recombinant modified vaccinia Ankara (MVA)." *PLoS One* 4(6): e5997.

- Dalrymple, J., Hasty SE, Kakach LT, Collett MS. (1989). "Mapping protective determinants of Rift Valley fever virus using recombinant vaccinia viruses." *Vaccines 89'* Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. p. 371–375.
- Daubney, R. J., Hudson J.R. and Garnham P.C. (1931). "Enzootic hepatitis of Rift Valley Fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and man from East Africa." *J. Pathol. Bacteriol.*, 34,543-579.
- Dautu, G., C. Sindato, et al. (2012). "Rift Valley fever: Real or perceived threat for Zambia?" *Onderstepoort J Vet Res* 79(2): E1-6.
- Davies, F. G., B. Clausen, et al. (1972). "The pathogenicity of Rift Valley fever virus for the baboon." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66(2): 363-365.
- Davis, B. S., G. J. Chang, et al. (2001). "West Nile virus recombinant DNA vaccine protects mouse and horse from virus challenge and expresses in vitro a noninfectious recombinant antigen that can be used in enzyme-linked immunosorbent assays." *J Virol* 75(9): 4040-4047.
- de Boer, S. M., J. Kortekaas, et al. (2010). "Rift Valley fever virus subunit vaccines confer complete protection against a lethal virus challenge." *Vaccine* 28(11): 2330-2339.
- de Boer, S. M., J. Kortekaas, et al. (2012). "Heparan sulfate facilitates Rift Valley fever virus entry into the cell." *J Virol* 86(24): 13767-13771.
- de Boer, S. M., J. Kortekaas, et al. (2012). "Acid-activated structural reorganization of the Rift Valley fever virus Gc fusion protein." *J Virol* 86(24): 13642-13652.
- do Valle, T. Z., A. Billecocq, et al. (2010). "A new mouse model reveals a critical role for host innate immunity in resistance to Rift Valley fever." *J Immunol* 185(10): 6146-6156.
- Dodd, K. A., B. H. Bird, et al. (2012). "Single-dose immunization with virus replicon particles confers rapid robust protection against Rift Valley fever virus challenge." *J Virol* 86(8): 4204-4212.
- Donnelly, J. J., B. Wahren, et al. (2005). "DNA vaccines: progress and challenges." *J Immunol* 175(2): 633-639.
- Drexler, I., K. Heller, et al. (1998). "Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara replicates in baby hamster kidney cells, a potential host for virus propagation, but not in various human transformed and primary cells." *J Gen Virol* 79 ( Pt 2): 347-352.
- Drexler, I., C. Staib, et al. (2004). "Modified vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential?" *Curr Opin Biotechnol* 15(6): 506-512.
- Dunachie, S. J., M. Walther, et al. (2006). "A clinical trial of prime-boost immunisation with the candidate malaria vaccines RTS,S/AS02A and MVA-CS." *Vaccine* 24(15): 2850-2859.
- Dungu, B., I. Louw, et al. (2010). "Evaluation of the efficacy and safety of the Rift Valley Fever Clone 13 vaccine in sheep." *Vaccine* 28(29): 4581-4587.
- Easterday, B. C. (1965). "Rift valley fever." *Adv Vet Sci* 10: 65-127.
- Easterday, B. C., G. M. Mc, et al. (1962). "The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs." *Am J Vet Res* 23: 470-479.

- Estcourt, M. J., S. Letourneau, et al. (2005). "Vaccine route, dose and type of delivery vector determine patterns of primary CD8+ T cell responses." *Eur J Immunol* 35(9): 2532-2540.
- Feltquate, D. M., S. Heaney, et al. (1997). "Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization." *J Immunol* 158(5): 2278-2284.
- Fernandez, J. C., A. Billecocq, et al. (2012). "The nonstructural protein NSs induces a variable antibody response in domestic ruminants naturally infected with Rift Valley fever virus." *Clin Vaccine Immunol* 19(1): 5-10.
- Ferron, F., Z. Li, et al. (2011). "The hexamer structure of Rift Valley fever virus nucleoprotein suggests a mechanism for its assembly into ribonucleoprotein complexes." *PLoS Pathog* 7(5): e1002030.
- Flick, R. and M. Bouloy (2005). "Rift Valley fever virus." *Curr Mol Med* 5(8): 827-834.
- Frank-Peterside, N. (2000). "Response of laboratory staff to vaccination with an inactivated Rift Valley fever vaccine--TSI-GSD 200." *Afr J Med Med Sci* 29(2): 89-92.
- Freiberg, A. N., M. B. Sherman, et al. (2008). "Three-dimensional organization of Rift Valley fever virus revealed by cryoelectron tomography." *J Virol* 82(21): 10341-10348.
- Galindo-Cardiel, I., N. Busquets, et al. (2012). "Lymphoplasmacytic endophthalmitis and anterior uveitis in sheep infected experimentally with rift valley fever virus." *J Comp Pathol* 146(1): 40-43.
- Garcia-Arriaza, J., V. Cepeda, et al. (2014). "A novel poxvirus-based vaccine, MVA-CHIKV, is highly immunogenic and protects mice against chikungunya infection." *J Virol* 88(6): 3527-3547.
- Garcia-Arriaza, J. and M. Esteban (2014). "Enhancing poxvirus vectors vaccine immunogenicity." *Hum Vaccin Immunother* 10(8).
- Garcia-Arriaza, J., C. E. Gomez, et al. (2014). "Deletion of the vaccinia virus N2L gene encoding an inhibitor of IRF3 improves the immunogenicity of modified vaccinia virus Ankara expressing HIV-1 antigens." *J Virol* 88(6): 3392-3410.
- Garcia, F., J. C. Bernaldo de Quiros, et al. (2011). "Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02)." *Vaccine* 29(46): 8309-8316.
- Gargan, T. P., 2nd, G. G. Clark, et al. (1988). "Vector potential of selected North American mosquito species for Rift Valley fever virus." *Am J Trop Med Hyg* 38(2): 440-446.
- Garry, C. E. and R. F. Garry (2004). "Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penitrenes)." *Theor Biol Med Model* 1: 10.
- Garver, K. A., S. E. LaPatra, et al. (2005). "Efficacy of an infectious hematopoietic necrosis (IHN) virus DNA vaccine in Chinook *Oncorhynchus tshawytscha* and sockeye *O. nerka* salmon." *Dis Aquat Organ* 64(1): 13-22.



- Gavrilovskaya, I. N., M. Shepley, et al. (1998). "beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12): 7074-7079.
- Gerdes, G. H. (2004). "Rift Valley fever." *Rev Sci Tech* 23(2): 613-623.
- Gerrard, S. R., B. H. Bird, et al. (2007). "The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection." *Virology* 359(2): 459-465.
- Gerrard, S. R. and S. T. Nichol (2002). "Characterization of the Golgi retention motif of Rift Valley fever virus G(N) glycoprotein." *J Virol* 76(23): 12200-12210.
- Gilbert, S. C. (2013). "Clinical development of Modified Vaccinia virus Ankara vaccines." *Vaccine* 31(39): 4241-4246.
- Gilbert, S. C., V. S. Moorthy, et al. (2006). "Synergistic DNA-MVA prime-boost vaccination regimes for malaria and tuberculosis." *Vaccine* 24(21): 4554-4561.
- Gilbert, S. C., J. Schneider, et al. (2002). "Enhanced CD8 T cell immunogenicity and protective efficacy in a mouse malaria model using a recombinant adenoviral vaccine in heterologous prime-boost immunisation regimes." *Vaccine* 20(7-8): 1039-1045.
- Giorgi, C., L. Accardi, et al. (1991). "Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses." *Virology* 180(2): 738-753.
- Gomez, C. E., J. L. Najera, et al. (2008). "The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer." *Curr Gene Ther* 8(2): 97-120.
- Gomez, C. E., J. L. Najera, et al. (2011). "MVA and NYVAC as vaccines against emergent infectious diseases and cancer." *Curr Gene Ther* 11(3): 189-217.
- Gomez, C. E., J. L. Najera, et al. (2011). "The HIV/AIDS vaccine candidate MVA-B administered as a single immunogen in humans triggers robust, polyfunctional, and selective effector memory T cell responses to HIV-1 antigens." *J Virol* 85(21): 11468-11478.
- Gorchakov, R., E. Volkova, et al. (2007). "Comparative analysis of the alphavirus-based vectors expressing Rift Valley fever virus glycoproteins." *Virology* 366(1): 212-225.
- Grobbelaar, A. A., J. Weyer, et al. (2011). "Molecular epidemiology of Rift Valley fever virus." *Emerg Infect Dis* 17(12): 2270-2276.
- Habjan, M., A. Pichlmair, et al. (2009). "NSs protein of rift valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase." *J Virol* 83(9): 4365-4375.
- Hanke, T., T. J. Blanchard, et al. (1998). "Enhancement of MHC class I-restricted peptide-specific T cell induction by a DNA prime/MVA boost vaccination regime." *Vaccine* 16(5): 439-445.
- Harrington, D. G., H. W. Lupton, et al. (1980). "Evaluation of a formalin-inactivated Rift Valley fever vaccine in sheep." *Am J Vet Res* 41(10): 1559-1564.

- Hartman, A. L., D. S. Powell, et al. (2013). "Aerosolized Rift Valley Fever virus causes fatal encephalitis in African green monkeys and common marmosets." *J Virol*.
- Hassett, D. E., J. Zhang, et al. (2000). "Immune responses following neonatal DNA vaccination are long-lived, abundant, and qualitatively similar to those induced by conventional immunization." *J Virol* 74(6): 2620-2627.
- Heise, M. T., A. Whitmore, et al. (2009). "An alphavirus replicon-derived candidate vaccine against Rift Valley fever virus." *Epidemiol Infect* 137(9): 1309-1318.
- Hervas-Stubbs, S., J. L. Perez-Gracia, et al. (2011). "Direct effects of type I interferons on cells of the immune system." *Clin Cancer Res* 17(9): 2619-2627.
- Hoch, A. L., T. P. Gargan, 2nd, et al. (1985). "Mechanical transmission of Rift Valley fever virus by hematophagous Diptera." *Am J Trop Med Hyg* 34(1): 188-193.
- Hoch, A. L., M. J. Turell, et al. (1984). "Replication of Rift Valley fever virus in the sand fly *Lutzomyia longipalpis*." *Am J Trop Med Hyg* 33(2): 295-299.
- Holman, D. H., A. Penn-Nicholson, et al. (2009). "A complex adenovirus-vectored vaccine against Rift Valley fever virus protects mice against lethal infection in the presence of preexisting vector immunity." *Clin Vaccine Immunol* 16(11): 1624-1632.
- Hubbard, K. A., A. Baskerville, et al. (1991). "Ability of a mutagenized virus variant to protect young lambs from Rift Valley fever." *Am J Vet Res* 52(1): 50-55.
- Hunter, P., B. J. Erasmus, et al. (2002). "Teratogenicity of a mutagenised Rift Valley fever virus (MVP 12) in sheep." *Onderstepoort J Vet Res* 69(1): 95-98.
- Huygen, K. (2005). "Plasmid DNA vaccination." *Microbes Infect* 7(5-6): 932-938.
- Ikegami, T. and S. Makino (2009). "Rift valley fever vaccines." *Vaccine* 27 Suppl 4: D69-72.
- Ikegami, T. and S. Makino (2011). "The pathogenesis of Rift Valley fever." *Viruses* 3(5): 493-519.
- Ikegami, T., K. Narayanan, et al. (2009). "Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF2alpha phosphorylation." *PLoS Pathog* 5(2): e1000287.
- Imam, I. Z., R. El-Karamany, et al. (1979). "An epidemic of Rift Valley fever in Egypt. 2. Isolation of the virus from animals." *Bull World Health Organ* 57(3): 441-443.
- Iman, I. Z., R. el-Karamany, et al. (1978). "Studies on goats experimentally infected with R.V.F. virus." *J Egypt Public Health Assoc* 53(3-4): 273-280.
- Iranpour, M., M. J. Turell, et al. (2011). "Potential for Canadian mosquitoes to transmit Rift Valley fever virus." *J Am Mosq Control Assoc* 27(4): 363-369.
- Jackel, S., M. Eiden, et al. (2013). "A novel indirect ELISA based on glycoprotein Gn for the detection of IgG antibodies against Rift Valley fever virus in small ruminants." *Res Vet Sci* 95(2): 725-730.
- Jacobs, B. L., J. O. Langland, et al. (2009). "Vaccinia virus vaccines: past, present and future." *Antiviral Res* 84(1): 1-13.

- Jansen van Vuren, P., CT. Tiemessen, JT. Paweska (2010). "Evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus subunit nucleocapsid protein as an immunogen in mice and sheep." *The Open Vaccine Journal* 3: 114–126.
- Jansen van Vuren, P. and J. T. Paweska (2009). "Laboratory safe detection of nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus in human and animal specimens by a sandwich ELISA." *J Virol Methods* 157(1): 15-24.
- Jansen van Vuren, P., A. C. Potgieter, et al. (2007). "Preparation and evaluation of a recombinant Rift Valley fever virus N protein for the detection of IgG and IgM antibodies in humans and animals by indirect ELISA." *J Virol Methods* 140(1-2): 106-114.
- Jansen van Vuren, P., C. T. Tiemessen, et al. (2011). "Anti-nucleocapsid protein immune responses counteract pathogenic effects of Rift Valley fever virus infection in mice." *PLoS One* 6(9): e25027.
- Johnson, B. K., A. C. Chanas, et al. (1978). "Rift Valley fever in Egypt, 1978." *Lancet* 2(8092 Pt 1): 745.
- Jup, P. G., A. Kemp, et al. (2002). "The 2000 epidemic of Rift Valley fever in Saudi Arabia: mosquito vector studies." *Med Vet Entomol* 16(3): 245-252.
- Kamal, S. A. (2009). "Pathological studies on postvaccinal reactions of Rift Valley fever in goats." *Virol J* 6: 94.
- Kark, J. D., Y. Aynor, et al. (1982). "A rift Valley fever vaccine trial. I. Side effects and serologic response over a six-month follow-up." *Am J Epidemiol* 116(5): 808-820.
- Kark, J. D., Y. Aynor, et al. (1985). "A Rift Valley fever vaccine trial: 2. Serological response to booster doses with a comparison of intradermal versus subcutaneous injection." *Vaccine* 3(2): 117-122.
- Kascsak, R. J. and M. J. Lyons (1978). "Bunyamwera virus. II. The generation and nature of defective interfering particles." *Virology* 89(2): 539-546.
- Keegan, K. and M. S. Collett (1986). "Use of bacterial expression cloning to define the amino acid sequences of antigenic determinants on the G2 glycoprotein of Rift Valley fever virus." *J Virol* 58(2): 263-270.
- Kortekaas, J. (2014). "One Health approach to Rift Valley fever vaccine development." *Antiviral Res* 106C: 24-32.
- Kortekaas, J., A. F. Antonis, et al. (2012). "Efficacy of three candidate Rift Valley fever vaccines in sheep." *Vaccine* 30(23): 3423-3429.
- Kortekaas, J., S. M. de Boer, et al. (2010). "Rift Valley fever virus immunity provided by a paramyxovirus vaccine vector." *Vaccine* 28(27): 4394-4401.
- Kortekaas, J., A. Dekker, et al. (2010). "Intramuscular inoculation of calves with an experimental Newcastle disease virus-based vector vaccine elicits neutralizing antibodies against Rift Valley fever virus." *Vaccine* 28(11): 2271-2276.
- Kortekaas, J., N. Oreshkova, et al. (2011). "Creation of a nonspreading Rift Valley fever virus." *J Virol* 85(23): 12622-12630.
- Kortekaas, J., N. Oreshkova, et al. (2014). "Comparative efficacy of two next-generation Rift Valley fever vaccines." *Vaccine*.
- Kutzler, M. A. and D. B. Weiner (2008). "DNA vaccines: ready for prime time?" *Nat Rev Genet* 9(10): 776-788.

- Lagerqvist, N., J. Naslund, et al. (2009). "Characterisation of immune responses and protective efficacy in mice after immunisation with Rift Valley Fever virus cDNA constructs." *Virology* 6: 6.
- LaMere, M. W., H. T. Lam, et al. (2011). "Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus." *J Immunol* 186(7): 4331-4339.
- Le Bon, A., V. Durand, et al. (2006). "Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8<sup>+</sup> T cell response during cross-priming." *J Immunol* 176(8): 4682-4689.
- Le Coupanec, A., D. Babin, et al. (2013). "Aedes mosquito saliva modulates Rift Valley fever virus pathogenicity." *PLoS Negl Trop Dis* 7(6): e2237.
- Le May, N., S. Dubaele, et al. (2004). "TFIIH transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus." *Cell* 116(4): 541-550.
- Le May, N., Z. Mansuroglu, et al. (2008). "A SAP30 complex inhibits IFN-beta expression in Rift Valley fever virus infected cells." *PLoS Pathog* 4(1): e13.
- Linthicum, K. J., A. Anyamba, et al. (1999). "Climate and satellite indicators to forecast Rift Valley fever epidemics in Kenya." *Science* 285(5426): 397-400.
- Linthicum, K. J., C. L. Bailey, et al. (1990). "Application of polar-orbiting, meteorological satellite data to detect flooding of Rift Valley Fever virus vector mosquito habitats in Kenya." *Med Vet Entomol* 4(4): 433-438.
- Linthicum, K. J., T. M. Logan, et al. (1989). "Transstadial and horizontal transmission of Rift Valley fever virus in *Hyalomma truncatum*." *Am J Trop Med Hyg* 41(4): 491-496.
- Liu, L., C. C. Celma, et al. (2008). "Rift Valley fever virus structural proteins: expression, characterization and assembly of recombinant proteins." *Virology* 5: 82.
- Lopez, N., R. Muller, et al. (1995). "The L protein of Rift Valley fever virus can rescue viral ribonucleoproteins and transcribe synthetic genome-like RNA molecules." *J Virol* 69(7): 3972-3979.
- Lorenzo, G., R. Martin-Folgar, et al. (2010). "Protection against lethal Rift Valley fever virus (RVFV) infection in transgenic IFNAR(-/-) mice induced by different DNA vaccination regimens." *Vaccine* 28(17): 2937-2944.
- Lorenzo, G., R. Martin-Folgar, et al. (2008). "Priming with DNA plasmids encoding the nucleocapsid protein and glycoprotein precursors from Rift Valley fever virus accelerates the immune responses induced by an attenuated vaccine in sheep." *Vaccine* 26(41): 5255-5262.
- Lozach, P. Y., R. Mancini, et al. (2010). "Entry of bunyaviruses into mammalian cells." *Cell Host Microbe* 7(6): 488-499.
- Male, D., J. Brostoff, D. Roth and I. Roitt (2006). "Immunology, 7th Edition UK: Elsevier."
- Mandell, R. B., R. Koukuntla, et al. (2010). "A replication-incompetent Rift Valley fever vaccine: chimeric virus-like particles protect mice and rats against lethal challenge." *Virology* 397(1): 187-198.
- Mansuroglu, Z., T. Josse, et al. (2010). "Nonstructural NSs protein of rift valley fever virus interacts with pericentromeric DNA sequences of the host cell,

- inducing chromosome cohesion and segregation defects." *J Virol* 84(2): 928-939.
- Martin, V., L. De Simone, et al. (2007). "Perspectives on using remotely-sensed imagery in predictive veterinary epidemiology and global early warning systems." *Geospat Health* 2(1): 3-14.
- Mayr, A. (2003). "Smallpox vaccination and bioterrorism with pox viruses." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 26(5-6): 423-430.
- McCurdy, L. H., B. D. Larkin, et al. (2004). "Modified vaccinia Ankara: potential as an alternative smallpox vaccine." *Clin Infect Dis* 38(12): 1749-1753.
- McShane, H., A. A. Pathan, et al. (2004). "Recombinant modified vaccinia virus Ankara expressing antigen 85A boosts BCG-primed and naturally acquired antimycobacterial immunity in humans." *Nat Med* 10(11): 1240-1244.
- Meegan, J. M., H. Hoogstraal, et al. (1979). "An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1977." *Vet Rec* 105(6): 124-125.
- Meier, R., A. Helenius, et al. (2012). "[DC-SIGN, a receptor for phlebovirus]." *Med Sci (Paris)* 28(1): 16-18.
- Meyer, H., G. Sutter, et al. (1991). "Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence." *J Gen Virol* 72 ( Pt 5): 1031-1038.
- Mims, C. A. (1956). "Rift Valley Fever virus in mice. I. General features of the infection." *Br J Exp Pathol* 37(2): 99-109.
- Moore, A. C. and A. V. Hill (2004). "Progress in DNA-based heterologous prime-boost immunization strategies for malaria." *Immunol Rev* 199: 126-143.
- Moorthy, V. S., S. McConkey, et al. (2003). "Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers." *Vaccine* 21(17-18): 1995-2002.
- Morrill, J. C., L. Carpenter, et al. (1991). "Further evaluation of a mutagen-attenuated Rift Valley fever vaccine in sheep." *Vaccine* 9(1): 35-41.
- Morrill, J. C., C. W. Czarniecki, et al. (1991). "Recombinant human interferon-gamma modulates Rift Valley fever virus infection in the rhesus monkey." *J Interferon Res* 11(5): 297-304.
- Morrill, J. C., T. Ikegami, et al. (2010). "Rapid accumulation of virulent rift valley Fever virus in mice from an attenuated virus carrying a single nucleotide substitution in the m RNA." *PLoS One* 5(4): e9986.
- Morrill, J. C., G. B. Jennings, et al. (1987). "Pathogenicity and immunogenicity of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus immunogen in pregnant ewes." *Am J Vet Res* 48(7): 1042-1047.
- Morrill, J. C., G. B. Jennings, et al. (1989). "Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferon-alpha." *Rev Infect Dis* 11 Suppl 4: S815-825.
- Morrill, J. C., C. A. Mebus, et al. (1997). "Safety and efficacy of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in cattle." *Am J Vet Res* 58(10): 1104-1109.
- Morrill, J. C., C. A. Mebus, et al. (1997). "Safety of a mutagen-attenuated Rift Valley fever virus vaccine in fetal and neonatal bovids." *Am J Vet Res* 58(10): 1110-1114.

- Moutailler, S., G. Krida, et al. (2010). "Replication of Clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, in *Aedes* and *Culex* mosquitoes." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(7): 681-688.
- Muller, R., O. Poch, et al. (1994). "Rift Valley fever virus L segment: correction of the sequence and possible functional role of newly identified regions conserved in RNA-dependent polymerases." *J Gen Virol* 75 ( Pt 6): 1345-1352.
- Muller, R., J. F. Saluzzo, et al. (1995). "Characterization of clone 13, a naturally attenuated avirulent isolate of Rift Valley fever virus, which is altered in the small segment." *Am J Trop Med Hyg* 53(4): 405-411.
- Mundel, B. and J. Gear (1951). "Rift valley fever; I. The occurrence of human cases in Johannesburg." *S Afr Med J* 25(44): 797-800.
- Naslund, J., N. Lagerqvist, et al. (2009). "Vaccination with virus-like particles protects mice from lethal infection of Rift Valley Fever Virus." *Virology* 385(2): 409-415.
- Neefjes, J. and C. Sadaka (2012). "Into the intracellular logistics of cross-presentation." *Front Immunol* 3: 31.
- Nfon, C. K., P. Marszal, et al. (2012). "Innate immune response to Rift Valley fever virus in goats." *PLoS Negl Trop Dis* 6(4): e1623.
- Niklasson, B. S., G. F. Meadors, et al. (1984). "Active and passive immunization against Rift Valley fever virus infection in Syrian hamsters." *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* 92(4): 197-200.
- Oelofsen, M. J. and E. Van der Ryst (1999). "Could bats act as reservoir hosts for Rift Valley fever virus?" *Onderstepoort J Vet Res* 66(1): 51-54.
- Okeke, M. I., O. Nilssen, et al. (2006). "Modified vaccinia virus Ankara multiplies in rat IEC-6 cells and limited production of mature virions occurs in other mammalian cell lines." *J Gen Virol* 87(Pt 1): 21-27.
- Olaleye, O. D., O. Tomori, et al. (1996). "Experimental infection of three Nigerian breeds of sheep with the Zinga strain of the Rift Valley Fever virus." *Rev Elev Med Vet Pays Trop* 49(1): 6-16.
- Olive, M. M., S. M. Goodman, et al. (2012). "The role of wild mammals in the maintenance of Rift Valley fever virus." *J Wildl Dis* 48(2): 241-266.
- Overby, A. K., R. F. Pettersson, et al. (2007). "The glycoprotein cytoplasmic tail of Uukuniemi virus (Bunyaviridae) interacts with ribonucleoproteins and is critical for genome packaging." *J Virol* 81(7): 3198-3205.
- Papin, J. F., P. H. Verardi, et al. (2011). "Recombinant Rift Valley fever vaccines induce protective levels of antibody in baboons and resistance to lethal challenge in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(36): 14926-14931.
- Pardigon, N., P. Vialat, et al. (1982). "Panhandles and hairpin structures at the termini of germiston virus RNAs (Bunyavirus)." *Virology* 122(1): 191-197.
- Patel, A. H. and R. M. Elliott (1992). "Characterization of Bunyamwera virus defective interfering particles." *J Gen Virol* 73 ( Pt 2): 389-396.
- Paweska, J. T., F. J. Burt, et al. (2003). "IgG-sandwich and IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in domestic ruminants." *J Virol Methods* 113(2): 103-112.

- Paweska, J. T., F. J. Burt, et al. (2005). "Validation of IgG-sandwich and IgM-capture ELISA for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans." *J Virol Methods* 124(1-2): 173-181.
- Paweska, J. T., E. Mortimer, et al. (2005). "An inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody to Rift Valley fever virus in humans, domestic and wild ruminants." *J Virol Methods* 127(1): 10-18.
- Paweska, J. T., S. J. Smith, et al. (2003). "Indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of antibody against Rift Valley fever virus in domestic and wild ruminant sera." *Onderstepoort J Vet Res* 70(1): 49-64.
- Pepin, M., M. Bouloy, et al. (2010). "Rift Valley fever virus(Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention." *Vet Res* 41(6): 61.
- Peters, C. J., D. Jones, et al. (1988). "Experimental Rift Valley fever in rhesus macaques." *Arch Virol* 99(1-2): 31-44.
- Peters, C. J., J. A. Reynolds, et al. (1986). "Prophylaxis of Rift Valley fever with antiviral drugs, immune serum, an interferon inducer, and a macrophage activator." *Antiviral Res* 6(5): 285-297.
- Peters, C. J. and T. W. Slone (1982). "Inbred rat strains mimic the disparate human response to Rift Valley fever virus infection." *J Med Virol* 10(1): 45-54.
- Pettersson, R. F. and C. H. von Bonsdorff (1975). "Ribonucleoproteins of Uukuniemi virus are circular." *J Virol* 15(2): 386-392.
- Pfeffer, M. and G. Dobler (2010). "Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration." *Parasit Vectors* 3(1): 35.
- Pichlmair, A., M. Habjan, et al. (2010). "Virus-like particles expressing the nucleocapsid gene as an efficient vaccine against Rift Valley fever virus." *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(7): 701-703.
- Pittman, P. R., C. T. Liu, et al. (1999). "Immunogenicity of an inactivated Rift Valley fever vaccine in humans: a 12-year experience." *Vaccine* 18(1-2): 181-189.
- Pretorius, A., M. J. Oelofsen, et al. (1997). "Rift Valley fever virus: a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa." *Am J Trop Med Hyg* 57(6): 693-698.
- Ramos, I., A. Alonso, et al. (2008). "Heterologous prime-boost vaccination with a non-replicative vaccinia recombinant vector expressing LACK confers protection against canine visceral leishmaniasis with a predominant Th1-specific immune response." *Vaccine* 26(3): 333-344.
- Rasmussen, R. A., R. Hofmann-Lehman, et al. (2002). "DNA prime/protein boost vaccine strategy in neonatal macaques against simian human immunodeficiency virus." *J Med Primatol* 31(1): 40-60.
- Reed, C., K. Lin, et al. (2013). "Aerosol exposure to Rift Valley fever virus causes earlier and more severe neuropathology in the murine model, which has important implications for therapeutic development." *PLoS Negl Trop Dis* 7(4): e2156.
- Reguera, J., F. Weber, et al. (2010). "Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription." *PLoS Pathog* 6(9): e1001101.

- Rep, C. C. D. (1998). "An outbreak of Rift Valley Fever, eastern Africa, 1997-1998." *Can Commun Dis Rep* 24(12): 101-104.
- Reyes-Sandoval, A. and H. C. Ertl (2001). "DNA vaccines." *Curr Mol Med* 1(2): 217-243.
- Rimmelzwaan, G. F. and G. Sutter (2009). "Candidate influenza vaccines based on recombinant modified vaccinia virus Ankara." *Expert Rev Vaccines* 8(4): 447-454.
- Rippy, M. K., M. J. Topper, et al. (1992). "Rift Valley fever virus-induced encephalomyelitis and hepatitis in calves." *Vet Pathol* 29(6): 495-502.
- Ritter, M., M. Bouloy, et al. (2000). "Resistance to Rift Valley fever virus in *Rattus norvegicus*: genetic variability within certain 'inbred' strains." *J Gen Virol* 81(Pt 11): 2683-2688.
- Robinson, H. L. and C. A. Torres (1997). "DNA vaccines." *Semin Immunol* 9(5): 271-283.
- Rodriguez, F. and J. L. Whitton (2000). "Enhancing DNA immunization." *Virology* 268(2): 233-238.
- Roger, M., S. Girard, et al. (2011). "Rift valley fever in ruminants, Republic of Comoros, 2009." *Emerg Infect Dis* 17(7): 1319-1320.
- Ross, T. M., N. Bhardwaj, et al. (2012). "Animal models of Rift Valley fever virus infection." *Virus Res* 163(2): 417-423.
- Saluzzo, J. F., J. P. Digoutte, et al. (1987). "Focus of Rift Valley fever virus transmission in southern Mauritania." *Lancet* 1(8531): 504.
- Saluzzo, J. F. and J. F. Smith (1990). "Use of reassortant viruses to map attenuating and temperature-sensitive mutations of the Rift Valley fever virus MP-12 vaccine." *Vaccine* 8(4): 369-375.
- Sall, A. A., P. M. Zanotto, et al. (1999). "Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature." *J Virol* 73(10): 8196-8200.
- Scharton, D., K. W. Bailey, et al. (2014). "Favipiravir (T-705) protects against peracute Rift Valley fever virus infection and reduces delayed-onset neurologic disease observed with ribavirin treatment." *Antiviral Res* 104: 84-92.
- Schmaljohn, C. S., M. D. Parker, et al. (1989). "Baculovirus expression of the M genome segment of Rift Valley fever virus and examination of antigenic and immunogenic properties of the expressed proteins." *Virology* 170(1): 184-192.
- Schneider, J., J. A. Langermans, et al. (2001). "A prime-boost immunisation regimen using DNA followed by recombinant modified vaccinia virus Ankara induces strong cellular immune responses against the *Plasmodium falciparum* TRAP antigen in chimpanzees." *Vaccine* 19(32): 4595-4602.
- Sissoko, D., C. Giry, et al. (2009). "Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008." *Emerg Infect Dis* 15(4): 568-570.
- Smith, D. R., B. H. Bird, et al. (2012). "Development of a novel nonhuman primate model for Rift Valley fever." *J Virol* 86(4): 2109-2120.
- Smith, D. R., K. E. Steele, et al. (2010). "The pathogenesis of Rift Valley fever virus in the mouse model." *Virology* 407(2): 256-267.



- Smithburn, K. C. (1949). "Rift Valley fever; the neurotropic adaptation of the virus and the experimental use of this modified virus as a vaccine." *Br J Exp Pathol* 30(1): 1-16.
- Soi, R. K., F. R. Rurangirwa, et al. (2010). "Protection of sheep against Rift Valley fever virus and sheep poxvirus with a recombinant capripoxvirus vaccine." *Clin Vaccine Immunol* 17(12): 1842-1849.
- Song, R., A. Porgador, et al. (1999). "Peptide-receptive class I major histocompatibility complex molecules on TAP-deficient and wild-type cells and their roles in the processing of exogenous antigens." *Immunology* 97(2): 316-324.
- Spik, K., A. Shurtleff, et al. (2006). "Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus." *Vaccine* 24(21): 4657-4666.
- Spik, K., A. Shurtleff, et al. (2006). "Immunogenicity of combination DNA vaccines for Rift Valley fever virus, tick-borne encephalitis virus, Hantaan virus, and Crimean Congo hemorrhagic fever virus." *Vaccine* 24(21): 4657-4666.
- Staib, C., I. Drexler, et al. (2004). "Construction and isolation of recombinant MVA." *Methods Mol Biol* 269: 77-100.
- Stittelaar, K. J., T. Kuiken, et al. (2001). "Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques." *Vaccine* 19(27): 3700-3709.
- Stober, C. B., U. G. Lange, et al. (2007). "Heterologous priming-boosting with DNA and modified vaccinia virus Ankara expressing trypan redoxin peroxidase promotes long-term memory against *Leishmania major* in susceptible BALB/c Mice." *Infect Immun* 75(2): 852-860.
- Swanepoel, R., and Paweska J. T. (2011). "Rift Valley fever." *Oxford Textbook of Zoonoses: Biology, Clinical Practice, and Public Health Control* (2 ed.) Chapter 36 p 423-431.
- Swanepoel, R. and N. K. Blackburn (1977). "Demonstration of nuclear immunofluorescence in Rift Valley fever infected cells." *J Gen Virol* 34(3): 557-561.
- Swanepoel, R., J. K. Struthers, et al. (1986). "Comparison of techniques for demonstrating antibodies to Rift Valley fever virus." *J Hyg (Lond)* 97(2): 317-329.
- Swanepoel, R., J. K. Struthers, et al. (1986). "Comparative pathogenicity and antigenic cross-reactivity of Rift Valley fever and other African phleboviruses in sheep." *J Hyg (Lond)* 97(2): 331-346.
- Terasaki, K., S. Murakami, et al. (2011). "Mechanism of tripartite RNA genome packaging in Rift Valley fever virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(2): 804-809.
- Tomori, O. (1979). "Clinical, virological and serological response of the West African dwarf sheep to experimental infection with different strains of Rift Valley fever virus." *Res Vet Sci* 26(2): 152-159.
- Tough, D. F. (2004). "Type I interferon as a link between innate and adaptive immunity through dendritic cell stimulation." *Leuk Lymphoma* 45(2): 257-264.

- Turell, M. J., C. L. Bailey, et al. (1988). "Vector competence of a Houston, Texas strain of *Aedes albopictus* for Rift Valley fever virus." *J Am Mosq Control Assoc* 4(1): 94-96.
- Turell, M. J., J. F. Saluzzo, et al. (1990). "Generation and transmission of Rift Valley fever viral reassortants by the mosquito *Culex pipiens*." *J Gen Virol* 71 ( Pt 10): 2307-2312.
- Turell, M. J., W. C. Wilson, et al. (2010). "Potential for North American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit rift valley fever virus." *J Med Entomol* 47(5): 884-889.
- Van der Lugt, J. J., J. A. Coetzer, et al. (1996). "Distribution of viral antigen in tissues of new-born lambs infected with Rift Valley fever virus." *Onderstepoort J Vet Res* 63(4): 341-347.
- van der Wal, F. J., R. P. Achterberg, et al. (2012). "Bead-based suspension array for simultaneous detection of antibodies against the Rift Valley fever virus nucleocapsid and Gn glycoprotein." *J Virol Methods* 183(2): 99-105.
- van Regenmortel, M. H., M. A. Mayo, et al. (2000). "Virus nomenclature: consensus versus chaos." *Arch Virol* 145(10): 2227-2232.
- Vialat, P., R. Muller, et al. (1997). "Mapping of the mutations present in the genome of the Rift Valley fever virus attenuated MP12 strain and their putative role in attenuation." *Virus Res* 52(1): 43-50.
- von Teichman, B., A. Engelbrecht, et al. (2011). "Safety and efficacy of Rift Valley fever Smithburn and Clone 13 vaccines in calves." *Vaccine* 29(34): 5771-5777.
- Waibler, Z., M. Anzaghe, et al. (2009). "Vaccinia virus-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components." *J Virol* 83(4): 1563-1571.
- Waibler, Z., M. Anzaghe, et al. (2007). "Modified vaccinia virus Ankara induces Toll-like receptor-independent type I interferon responses." *J Virol* 81(22): 12102-12110.
- Walter, C. T. and J. N. Barr (2011). "Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses." *J Gen Virol* 92(Pt 11): 2467-2484.
- Wallace, D. B., C. E. Ellis, et al. (2006). "Protective immune responses induced by different recombinant vaccine regimes to Rift Valley fever." *Vaccine* 24(49-50): 7181-7189.
- Wang, Z., P. J. Troilo, et al. (2004). "Detection of integration of plasmid DNA into host genomic DNA following intramuscular injection and electroporation." *Gene Ther* 11(8): 711-721.
- Warimwe, G. M., G. Lorenzo, et al. (2013). "Immunogenicity and efficacy of a chimpanzee adenovirus-vectored Rift Valley Fever vaccine in mice." *Virol J* 10(1): 349.
- Wasmoen, T. L., L. T. Kakach, et al. (1988). "Rift Valley fever virus M segment: cellular localization of M segment-encoded proteins." *Virology* 166(1): 275-280.
- Weaver, S. C. and W. K. Reisen (2010). "Present and future arboviral threats." *Antiviral Res* 85(2): 328-345.

- Weingartl, H. M., S. Zhang, et al. (2014). "Rift Valley Fever Virus Incorporates the 78 kDa Glycoprotein into Virions Matured in Mosquito C6/36 Cells." *PLoS One* 9(1): e87385.
- Won, S., T. Ikegami, et al. (2006). "NSm and 78-kilodalton proteins of Rift Valley fever virus are nonessential for viral replication in cell culture." *J Virol* 80(16): 8274-8278.
- Won, S., T. Ikegami, et al. (2007). "NSm protein of Rift Valley fever virus suppresses virus-induced apoptosis." *J Virol* 81(24): 13335-13345.
- Xiao, X., Y. Feng, et al. (2011). "Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor." *Biochem Biophys Res Commun* 411(2): 253-258.
- Xu, F., H. Chen, et al. (2007). "Phylogenetic relationships among sandfly fever group viruses (Phlebovirus: Bunyaviridae) based on the small genome segment." *J Gen Virol* 88(Pt 8): 2312-2319.
- Xu, W., D. M. Watts, et al. (2013). "The nucleocapsid protein of Rift Valley fever virus is a potent human CD8+ T cell antigen and elicits memory responses." *PLoS One* 8(3): e59210.
- Zamoto-Niikura, A., K. Terasaki, et al. (2009). "Rift valley fever virus L protein forms a biologically active oligomer." *J Virol* 83(24): 12779-12789.
- Zeller, H. G., D. Fontenille, et al. (1997). "Enzootic activity of Rift Valley fever virus in Senegal." *Am J Trop Med Hyg* 56(3): 265-272.

## **X ANEXO**



## Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de distribución de la RVF.	19
Figura 2. Representación esquemática del ciclo enzoótico y epidémico-epizoótico del RVFV.	22
Figura 3. Estructura del virión de la familia Bunyaviridae.	25
Figura 4. Organización genómica del RVFV.	26
Figura 5. Representación esquemática del ciclo de infección viral del RVFV en la célula.	31
Figura 6. Esquema general del vector <i>shuttle</i> empleado para la obtención de MVA <sub>r</sub> .	67
Figura 7. Esquema de infección-transfección para la obtención de MVA <sub>r</sub> .	69
Figura 8. Esquema de los plásmidos pCMV-M4 (A) y pCMV-N (B).	83
Figura 9. IFI sobre células BHK-21 transfectadas con los diferentes plásmidos.	84
Figura 10. WB con lisados de células BHK-21 transfectadas con los plásmidos pCMV-N y pCMV-GFP.	84
Figura 11. WB realizados con lisados de células BHK-21 infectadas con MVA-GnGc y MVA-N.	86
Figura 12. WB realizados con lisados de células BHK-21 infectadas con MVA-Gn y MVA-Gc.	86
Figura 13. Tinción con Hoechst sobre células BHK-21 infectadas con MVA-Gc.	87
Figura 14. IFI sobre células BHK-21 infectadas con diferentes MVA <sub>r</sub> .	89
Figura 15. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con los aislados de RVFV 56/74 y AR 20368.	91
Figura 16. Detección de Ac mediante ELISA de captura en sueros de animales inoculados con ambas cepas, a una dilución 1/80.	91
Figura 17. Supervivencia de ratones BALB/c inoculados con diferentes dosis de RVFV 56/74.	93
Figura 18. IFI en células Vero infectadas con MP12 RVFV, utilizando como Ac primario un suero de ratón inoculado con la cepa RVFV 56/74.	93
Figura 19. WB realizado con sueros de ratones inoculados con RVFV 56/74 para la detección de proteínas del virus MP12 RVFV.	93
Figura 20. Esquema del diseño experimental de eficacia vacunal en ratones BALB/c.	95
Figura 21. Datos de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA expresando las glicoproteínas Gn y Gc de RVFV.	97
Figura 22. Datos de supervivencia en ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA expresando la nucleoproteína N de RVFV.	98
Figura 23. Aislamiento viral en sangre de los diferentes grupos inmunizados con vacunas ADN/MVA a 3 dpi.	99
Figura 24. Título de Ac neutralizantes en sueros de animales inmunizados con ADN/MVA predesafío (A) y postdesafío (B).	102
Figura 25. Detección de Ac mediante ELISA de captura en sueros de ratones vacunados con ADN/MVA predesafío (A) y postdesafío (B), a una dilución 1/80.	103

Figura 26. Detección de Ac frente a las proteínas del virus MP12 RVFV por WB.	104
Figura 27. Título de Ac anti-RVFV detectados por IFI en sueros de ratones inmunizados con vacunas ADN/MVA.	105
Figura 28. IFI sobre células Vero infectadas con MP12 RVFV con sueros de animales inmunizados con diferentes estrategias ADN/MVA predesafío.	106
Figura 29. Detección de IFN- $\gamma$ mediante ELISPOT con esplenocitos de animales inmunizados con una dosis de MVA-GnGc (A) o una dosis de MVA-N (B).	108
Figura 30. ELISPOT IFN- $\gamma$ de los animales inmunizados con vacunas ADN y/o MVA codificando las glicoproteínas Gn y Gc con los péptidos teóricos restringidos a MHC de clase I 4, 13, 14 y 15.	110
Figura 31. Detección de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en presencia de los péptidos 4, 13, 14 y 15 de GnGc mediante ICCS. <0,05; **= p<0,001; ***=p<0,0001).	112
Figura 32. Datos de supervivencia y morbilidad tras el desafío con MP12 RVFV en ratones IFNAR <sup>-/-</sup> inmunizados con MVAr.	113
Figura 33. Datos de supervivencia tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones 129Sv/Ev wt (A) e IFNAR <sup>-/-</sup> (B) inmunizados con MVA-GnGc.	115
Figura 34. Datos de supervivencia tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-N.	115
Figura 35. ELISA de captura con sueros predesafío de ratones IFNAR <sup>-/-</sup> y 129Sv/Ev wt inmunizados con una dosis de MVA-N (dilución 1/100).	116
Figura 36. Detección de IFN tipo I en sueros de ratones 129Sv/Ev wt inmunizados con MVA-GnGc recogidos a diferentes tiempos post-inmunización, y ensayados mediante ELISA IFN- $\alpha$ (A) y actividad antiviral (B).	118
Figura 37. Supervivencia en ratones BALB/c (A) y 129Sv/Ev wt (B) inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc y MVA-GnGc tras el desafío.	119
Figura 38. Título de Ac neutralizantes predesafío en sueros de ratones BALB/c (A) y 129Sv/Ev wt (B) inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc, MVA-GnGc y MVA control.	120
Figura 39. Título de Ac neutralizantes postdesafío en sueros de ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt.	121
Figura 40. ELISPOT IFN- $\gamma$ realizado con <i>pools</i> de PBLs de ratones BALB/c inmunizados con MVA-Gn, MVA-Gc, MVA-GnGc y MVA control.	122
Figura 41. ELISPOT IFN- $\gamma$ de esplenocitos de ratones BALB/c obtenidos a día 7 y 14 tras la inmunización con MVA codificando las glicoproteínas Gn y/o Gc.	123
Figura 42. Estimulación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> en presencia de los péptidos GnGc mediante ICCS a día 14 post-inmunización.	124
Figura 43. Niveles de IL-6 en ss de <i>pools</i> de esplenocitos estimulados a diferentes tiempos.	125
Figura 44. Niveles de IL-2 en ss de <i>pools</i> de esplenocitos estimulados a diferentes tiempos.	126
Figura 45. Esquema del diseño experimental de eficacia vacunal empleado en ovino.	127
Figura 46. Detección de la mucosa hiperémica a 2 y 4 dpi en los grupos MVA-GnGc, MVA control y no inmunizado.	128

Figura 47. Evaluación de los signos clínicos tardíos tras el desafío en los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B) y no inmunizado (C).....	129
Figura 48. Tª corporal de las ovejas de los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B), control no inmunizado (C) registrados diariamente tras el desafío viral. ....	131
Figura 49. Título de Ac neutralizantes en sueros de los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B), control no inmunizado (C) y media $\pm$ DS de cada grupo (D), a 0, 5, 9 y 16 dpi.....	136
Figura 50. Detección de Ac anti-N en los grupos MVA-GnGc (A), MVA control (B) y control no inmunizado (C) a 0, 5, 9 y 16 dpi mediante ELISA de competición. .	137

## Índice de Tablas

Tabla 1. Familia <i>Bunyaviridae</i> donde el virus tipo de cada género aparece subrayado. ....	23
Tabla 2. Susceptibilidad de los hospedadores vertebrados al RVFV. ....	35
Tabla 3. Historia de los aislados virulentos del RVFV. ....	65
Tabla 4. MVAr generados frente a RVFV. ....	67
Tabla 5. Oligonucleótidos fosforilados empleados para la generación de los plásmidos pMVA-GFP-Gn y pMVA-GFP-Gc RVFV.....	68
Tabla 6. Anticuerpos secundarios conjugados con HRPO empleados en WB.....	72
Tabla 7. Anticuerpos secundarios empleados en IFI.....	73
Tabla 8. Péptidos teóricos de las glicoproteínas GnGc de RVFV restringidos a MHC clase I. ....	75
Tabla 9. Péptidos teóricos de la nucleoproteína N de RVFV restringidos a MHC clase I. ....	75
Tabla 10. Morbilidad de los animales inoculados con diferentes dosis de RVFV 56/74.....	92
Tabla 11. Ratones BALB/c inmunizados con vacunas ADN/MVA recombinantes. ....	95
Tabla 12. Morbilidad y mortalidad de ratones BALB/c inmunizados con ADN/MVA.....	96
Tabla 13. Detección de ARN viral en sangre a 3 dpi por RT-qPCR.....	100
Tabla 14. Morbilidad observada tras el desafío con RVFV 56/74 en las dos cepas de ratones. ....	114
Tabla 15. Morbilidad y mortalidad tras el desafío con RVFV 56/74 en ratones BALB/c y 129Sv/Ev wt inmunizados con los MVAr. ....	119
Tabla 16. Grupos de corderos empleados. ....	127
Tabla 17. Viremia en sangre tras el desafío analizado mediante qRT-PCR y aislamiento viral.....	133
Tabla 18. Virus detectado en hisopos nasales y bucales tras el desafío analizado mediante qRT-PCR y aislamiento viral.....	134